



UNIVERSITA' DI PISA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Corso di laurea specialistica in Medicina Veterinaria

**MONITORAGGIO SANITARIO
DELL'AVIFAUNA:
IL RUOLO DELLE ZANZARE NELLA
DIFFUSIONE DI VIRUS DEL GRUPPO
ENCEFALITE GIAPPONESE IN TOSCANA**

Candidato:

Valerio Guiggi

Relatore:

Prof. Paolo Mani

Correlatore:

Prof. Paolo Ravanini

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

Indice

| | |
|---|----|
| Indice | 2 |
| Premessa..... | 4 |
| Parte Generale | 6 |
| I Flavivirus | 7 |
| Classificazione Flaviviridae | 11 |
| Gruppi di Flavivirus mosquito-borne..... | 12 |
| Gruppo Aroa..... | 12 |
| Gruppo Dengue..... | 13 |
| Gruppo Kobobera..... | 14 |
| Gruppo Natya..... | 15 |
| Gruppo Spodweni | 17 |
| Gruppo Febbre Gialla | 18 |
| Gruppo Encefalite Giapponese | 21 |
| Virus Cacipacore..... | 21 |
| Virus Encefalite Giapponese..... | 22 |
| Virus Koutango | 24 |
| Virus Encefalite Murray Valley | 25 |
| Virus Encefalite di Saint Louis..... | 27 |
| Virus Usutu..... | 29 |
| Virus West Nile..... | 31 |
| Virus Yaounde | 33 |
| Monitoraggio Sanitario in Toscana..... | 34 |
| Area di Studio..... | 49 |
| Le zanzare | 56 |
| Morfologia delle Zanzare | 57 |
| Ciclo Biologico dei Culicidi | 59 |
| Specie di Zanzare capaci di trasmettere virus del gruppo Encefalite Giapponese..... | 62 |
| Genere Culex..... | 63 |
| Genere Aedes..... | 68 |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| Genere Anopheles..... | 72 |
| Genere Armigeres | 74 |
| Parte Sperimentale | 75 |
| Materiali e Metodi | 76 |
| Risultati | 85 |
| Considerazioni e Conclusioni..... | 94 |
| Conclusioni | 110 |
| Bibliografia | 111 |
| Sitografia | 116 |
| Sitografia delle Immagini | 116 |

PREMESSA

Questa tesi ha origine da una complessa e articolata attività di ricerca portata avanti negli ultimi quaranta anni nella Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa, nei settori di Malattie Infettive, Parassitarie e Patologia aviare.

Si tratta di ricerche orientate alla diagnosi delle malattie degli animali selvatici e al loro ruolo nella diffusione di agenti patogeni ai domestici e all'uomo.

Tale attività ha portato a monitorare le popolazioni selvatiche sul territorio in un periodo storico caratterizzato da un grande interesse per le problematiche ambientali e la salvaguardia degli animali nel loro habitat. Nasce così la collaborazione con Parchi Naturali e Aree Faunistiche Protette con un notevole contributo alla conoscenza dei problemi degli animali ricollegabili con l'ambiente e si sviluppa l'Ecopatologia, la nuova disciplina che negli ultimi decenni ha teso a utilizzare le popolazioni selvatiche come sensibili indicatori ambientali in grado di rilevare subdole forme di inquinamento o insidiose modificazioni di habitat.

Un contributo importante al monitoraggio sanitario delle popolazioni selvatiche sul territorio è stato fornito dalla collaborazione con i Centri di Recupero della fauna selvatica operanti nella nostra regione, soprattutto quando all'interesse istituzionale per il recupero e la reintroduzione degli animali nel territorio si è affiancato l'interesse per le cause che ne determinano la morte.

E' in questo periodo che i *Flavivirus* appartenenti al gruppo encefalite giapponese (JE Group) fanno la loro comparsa in Toscana, in un'area umida compresa fra le province di Firenze e Pistoia, nei dintorni del Padule di Fucecchio.

Infatti nel 1996 il *virus dell'Encefalite Giapponese* (JEV) viene segnalato in un episodio caratterizzato da mortalità in merli e altri uccelli selvatici, mentre nel 1998 il *virus West Nile* (WNV) viene isolato da cavalli morti o sottoposti a eutanasia. Ambedue gli episodi si sono verificati a fine estate, inizio autunno, nella stessa area geografica e sono stati caratterizzati da sintomi e lesioni a carico del Sistema Nervoso Centrale.

La nostra tesi riporta i risultati del monitoraggio sanitario comprensivi di esami anatomo-istopatologici e virologici effettuati su uccelli selvatici morti, di indagini sierologiche su popolazioni recettive e di controlli sulle zanzare, potenziali vettori di virus del gruppo encefalite giapponese.

PARTE GENERALE.

I FLAVIVIRUS

Il genere *Flavivirus*, appartiene alla Famiglia *Flaviviridae*, alla quale appartengono anche *Pestivirus* e *Hepacivirus*.

I *Flavivirus* sono virus a RNA a singolo filamento, a simmetria cubica, dotati di envelope, di 40-60 nm di diametro. L'RNA codifica tre proteine strutturali: quelle del capside (C), della premembrana/membrana (PrM/M) e dell'Envelope (E) e sette proteine non strutturali: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. L'Envelope virale contiene le proteine PrM, M ed E: la proteina E è il maggior determinante antigenico del virus, conferisce potere emoagglutinante ed è coinvolto nell'adesione e nell'adsorbimento del virione nella cellula, la proteina PrM è essenziale per le successive fasi di replicazione e maturazione e interagisce con la proteina M nella fase di liberazione del virione dalla cellula (Lindenbach e Rice, 2003)(Fig.1).

Le proteine non strutturali contribuiscono a varie fasi della replicazione virale ed in particolare NS5 ha funzione di RNA polimerasi RNA dipendente (McMinn, 1977).

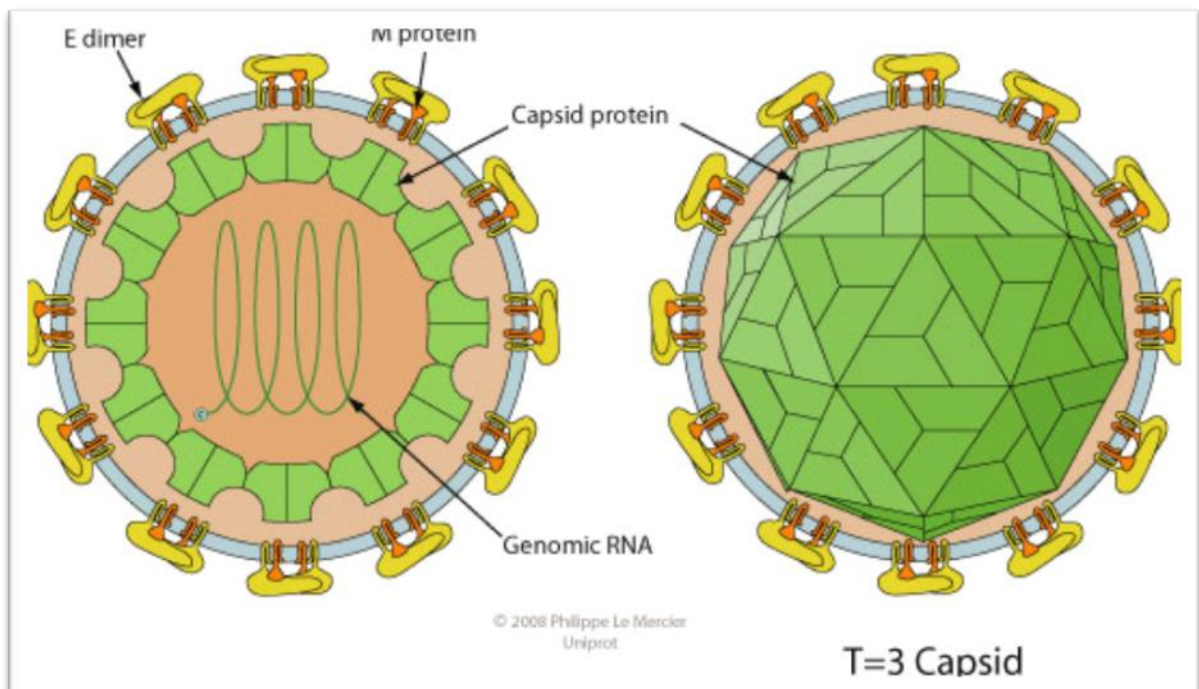


Figura 1: Rappresentazione schematica di un *Flavivirus*

I virioni si formano nelle regioni perinucleari del citoplasma in associazione con le membrane del Golgi o con il reticolo endoplasmatico liscio. I virioni appaiono all'interno dei vacuoli citoplasmatici e sembrano uscire dalla cellula come i vacuoli, fondendosi con la membrana plasmatica (Fig.2).

Le proteine dei *Flavivirus* si formano per scissione co- o post-trasduzionale delle poliproteine codificate dal genoma (Schmaljohn e McClain, 1996).

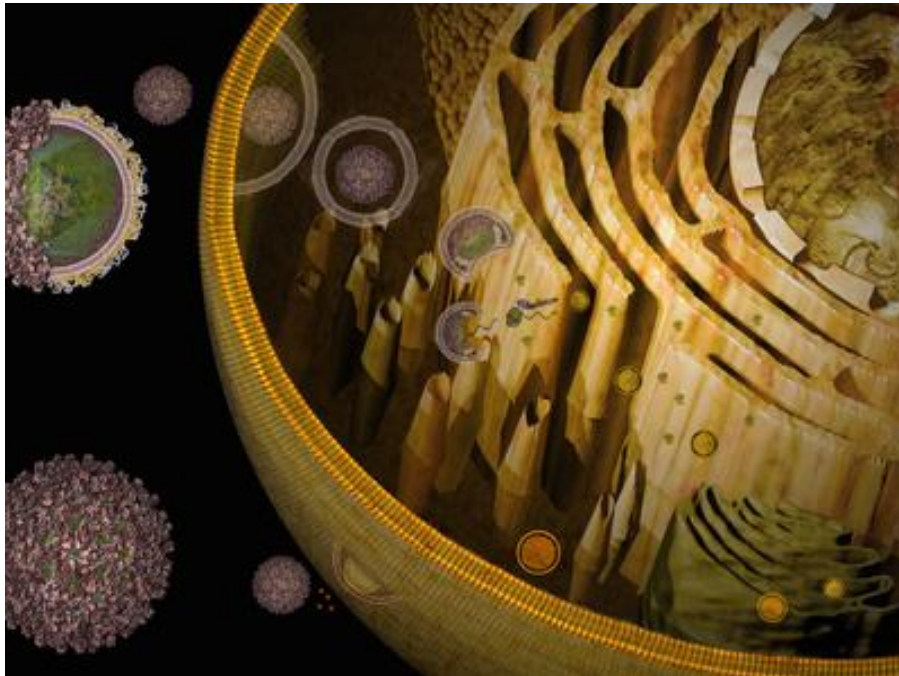


Figura 2: Replicazione dei *Flavivirus* nella cellula

I *Flavivirus* sono trasmessi da artropodi e per tale ragione in passato erano classificati fra gli *Arbovirus* da “*artropode borne*”.

La maggior parte dei *Flavivirus* si diffonde replicando alternativamente in un ciclo ospite vertebrato - artropode ematofago. Gli artropodi acquisiscono il virus con un pasto di sangue su un ospite in fase di viremia e lo trasmettono ad un altro ospite recettivo.

All'interno del genere vengono distinti due gruppi, i *Flavivirus mosquito-borne*, trasmessi da zanzare, e i *Flavivirus tick-borne*, trasmessi da zecche.

Fra gli ospiti vertebrati sono comprese varie specie di mammiferi, uccelli e rettili.

Alcuni *Flavivirus mosquito-borne* colpiscono prevalentemente l'uomo, in particolare il *virus Dengue* (DENV) che è esclusivo per l'uomo, mentre altri hanno anche l'uomo fra i numerosi ospiti recettivi, come il *virus della Febbre Gialla* (YFV) che colpisce uomo e altri primati.

I *Flavivirus mosquito-borne* vengono trasmessi esclusivamente da zanzare femmina che possiedono un apparato boccale di tipo pungente-succhiante in grado in una prima fase di assumere il virus presente nel sangue dell'ospite infetto, in una seconda di inocularlo tramite saliva infetta.

Nell'ospite vertebrato il virus replica in cellule del sistema immunitario a livello di linfonodi regionali ed a tale fase segue viremia.

L'infezione latente e la sieroconversione positiva, in assenza di sintomi ricollegabili alla malattia, sono comuni nelle popolazioni recettive, ma in alcuni casi il tasso di mortalità può essere elevato anche se limitato ad alcune specie e solo in particolari episodi.

Ai *Flavivirus mosquito-borne* sono riconducibili nell'uomo tre principali patologie: l'encefalite, il rash cutaneo e la febbre emorragica.

I *Flavivirus mosquito-borne* sono stati isolati da ospiti e/o vettori in tutti i continenti tranne che in Antartide; alcuni hanno una distribuzione estremamente ampia come il *West Nile Virus* (WNV), mentre altri si trovano solamente in aree endemiche più o meno estese.

La virulenza degli stipiti isolati viene valutata in laboratorio prevalentemente con inoculazione sperimentale in topo per via intracerebrale e/o sottocutanea. La "neurovirulenza" indica la capacità del virus di dare encefalite caratterizzata da quadri macroscopici ed istologici analoghi a quelli rilevati in natura, mentre la "neuroinvasività" indica la capacità del virus di replicarsi nei tessuti periferici (es. il sottocute) e di invadere successivamente per viremia il sistema nervoso centrale (McMinn, 1997). Tali indagini sperimentali hanno portato a identificare un certo numero di determinanti molecolari di neuroinvasività e neurovirulenza, come descritto da Lee e Lobigs nel 2000 e da Hurrelbrink e McMinn nel 2003.

La virulenza sperimentale nel topo però non corrisponde necessariamente alla virulenza riscontrata in natura in specie recettive, incluso l'uomo (Schmaljohn e McClain, 1996).

Recentemente, la ricerca di marcatori di virulenza è stata estesa agli ospiti naturali. Brault et al., nel 2007, hanno dimostrato che una singola sostituzione del frammento 249 della proteina NS3 a WNV conferisce a tale virus modificato una maggiore patogenicità nel corvo americano (*Corvus brachyrhynchos*) rispetto ai virus che non mostrano questa sostituzione. Infatti tutti i filamenti di WNV che si sono dimostrati patogeni per gli uccelli fino adesso (New York nel 1999, Israele nel 1998, Egitto nel 1951, Ungheria nel 2003) hanno questa sostituzione particolare, mentre i WNV che non sono patogeni per gli uccelli non mostrano questa sostituzione.

Ai *Flavivirus mosquito-borne* appartengono 7 gruppi virali. Il gruppo encefalite giapponese è trattato in modo più approfondito in questa tesi.

CLASSIFICAZIONE FLAVIVIRIDAE

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2013

- Family: Flaviviridae
 - Genus: *Flavivirus*
 - *Flavivirus Tick-borne*
 - *Flavivirus Mosquito-borne*
 - **Aroa virus group**
 - **Dengue virus group**
 - **Japanese encephalitis virus group**
 - *Cacipacore virus*
 - *Cacipacore virus* (CPCV)
 - *Japanese encephalitis virus*
 - *Japanese encephalitis virus* (JEV)
 - *Koutango virus*
 - *Koutango virus* (KOUV)
 - *Murray Valley encephalitis virus*
 - *Alfuy virus* (ALFV)
 - *Murray Valley encephalitis virus* (MVEV)
 - *St. Louis encephalitis virus*
 - *St. Louis encephalitis virus* (SLEV)
 - *Usutu virus*
 - *Usutu virus* (USUV)
 - *West Nile virus*
 - *Kunjin virus* (KUNV)
 - *West Nile virus* (WNV)
 - *Yaounde virus*
 - *Yaounde virus* (YAOV)
 - **Kokobera virus group**
 - **Ntaya virus group**
 - **Spondweni virus group**
 - **Yellow fever virus group**
 - Viruses with no known arthropod vector
 - Genus: *Pestivirus*
 - Genus: *Hepacivirus*
 - Genus: unassigned viruses

Scheda 1: Classificazione dei *Flaviviridae*

GRUPPI DI FLAVIVIRUS MOSQUITO-BORNE

Gruppo Aroa

Il gruppo virale Aroa include una sola specie virale, *Aroa virus*, che è divisa in quattro sottotipi isolati esclusivamente nell'America del sud.

- Il *virus Aroa* (AROAV) isolato da una talpa sentinella in Venezuela (ma non dalle zanzare);
- Il *virus Iguape* (IGUV) isolato da un topo sentinella in Brasile;
- Il *virus Naranjal* (NJLV) isolato da una talpa sentinella e da zanzare in Ecuador;
- Il *virus Abussuquara* (BSQV) isolato nei roditori selvatici e dalle zanzare in Brasile, Colombia e Panama ed associato ad un singolo caso di malattia febbrile con dolore alle articolazioni in un uomo (Karabatsos, 1985; Figueiredo, 2000).

Scheda 2: Gruppo virale Aroa

Gruppo Dengue

Il gruppo di virus Dengue comprende i *virus Dengue* 1-4 e il *virus Kedougou*, che, secondo Kuno e Chang (2007) ha una correlazione genetica troppo bassa per essere inserito in tale gruppo. I quattro ceppi del *virus Dengue* causano malattia solo nell' uomo; annualmente si verificano circa 50 milioni di casi, e i più gravi, con rash cutaneo, rappresentano dall'1 al 10% dei casi totali. L'uomo è il maggior serbatoio anche se occasionalmente alcuni primati nel sud-est asiatico e nell'Africa tropicale sono risultati essere ospiti a fondo cieco. Il vettore primario dei virus di tale gruppo è l'*Aedes aegypti*, ma è stato provato che anche *Aedes albopictus* può essere un vettore in grado di trasmettere la malattia (Fontenille et al., 2007; Gould e Solomon, 2008).

Il *virus Kedougou* (KEDV) è stato invece isolato solamente da zanzare del genere *Aedes* in Africa (Senegal, Repubblica dell'Africa Centrale) e non sono riportate al momento malattie associate a questo virus nei vertebrati (Calisher e Gould, 2003; Adam e Digoutte, 2005).

Scheda 3: Gruppo virale Dengue

Gruppo Kokobera

Il gruppo Kokobera include *Kokobera virus*, con due stipiti : *Kokobera virus* (KOKV) e *Stratford virus* (STRV) isolati da zanzare in Australia e Papua Nuova Guinea.

- Il primo è stato isolato originariamente nel 1960 da zanzare *Culex annulirostris* in Australia e Papua Nuova Guinea, la positività sierologica è stata rilevata in canguri e orsi che possono essere considerati ospiti serbatoio di KOKV. Le infezioni umane da KOKV possono essere rinvenute occasionalmente in presenza di malattie caratterizzate da poliartrite (Nisbet et al., 2005).
- Lo *Stratford virus* (STRV) recentemente isolato da zanzare in Australia è assegnato in modo provvisorio a questo gruppo, in quanto geneticamente molto simile a KOKV, e non sembra essere patogeno per i vertebrati (Nisbet et al., 2005).

Scheda 4: Gruppo virale Kobobera

Gruppo Natya

Il gruppo virale Natya comprende cinque virus:

- Il virus *Ilheus* (ILHV) è stato uno dei primi *Flavivirus* isolati. La classificazione creata dall'ICTV riconosce due sottotipi, il virus *Ilheus* (ILHV) e il virus *Rocio* (ROCV).

ILHV è stato isolato da zanzare nella città di Ilheus, nella costa est del Brasile. Tuttavia è presente in molte regioni del Sudamerica e dell'America Centrale, e i soli ospiti conosciuti sono gli uccelli.

ILHV non è associato con malattie epidemiche ma è stato isolato sporadicamente da uccelli malati che presentavano malattia febbrile acuta e mialgia, in vari paesi (Brasile, Trinidad, Panama, Argentina, Colombia, Ecuador); in alcuni casi era presente una forma lieve di meningoencefalite con fotofobia (Karabatsos, 1985; Figueiredo, 2000; Shope, 2003).

ROCV ha causato almeno due epidemie umane di encefalite, nel 1973 e nel 1990 nelle regioni sudorientali del Brasile. Durante queste epidemie si sono verificati più di 1000 casi clinici di cui circa 100 concluse con decessi e 200 che, pur non essendo fatali, hanno comunque riportato conseguenze.

In queste regioni c'è un'evidenza sierologica della continua circolazione del virus: le zanzare delle specie *Psorophora ferox* e *Ochlerotatus scapularis* sono vettori competenti, fatto confermato da indagini di laboratorio. Gli ospiti serbatoio naturali, invece, sono al momento sconosciuti. I fattori che hanno portato dall'improvvisa emergenza alla scomparsa dei casi clinici rimangono ignoti, di conseguenza c'è la possibilità che il ROCV possa riemergere in futuro (Figueiredo, 2000; Shope, 2003).

- Il virus *Bagaza* (BAGV) è stato isolato da zanzare nell'Africa meridionale e occidentale ma non associato a malattie in animali o uomo (Adam e Digoutte, 2005). Recentemente il virus è stato strettamente correlato geneticamente con ITV.
- Il virus della *Meningoencefalite Israeliana del Tacchino* (ITV) è stato scoperto da Komarov et al. nel 1960, e fino ad adesso il virus è stato isolato solamente in Israele e in Sudafrica (Barnard et al., 1980); ITV è trasmesso da zanzare del genere *Aedes* e *Culex* (Braverman et al., 1981; Braverman et al., 2003). La malattia colpisce solamente i tacchini e nessuna altra specie animale: i segni sono neurologici caratterizzati da riluttanza al movimento, paralisi del collo, incoordinazione e morte.

La malattia si verifica di solito nelle stagioni estiva e autunnale, negli animali di 8-20 settimane di età, e la mortalità può raggiungere il 30%. Nel 1975 è stato sviluppato un vaccino che ha portato ad una diminuzione del numero di casi (Perelman et al., 2012).

- Il *virus Ntaya* (NATV) è stato isolato da numerose specie di zanzare in Africa (Uganda, Camerun, Repubblica dell'Africa Centrale). Non è mai stato associato con malattie umane o animali (Adam e Digoutte, 2005).
- Il *virus Tembusu* (TMUV) è stato isolato dalle zanzare (prevalentemente da *Culex tritaeniorhynchus*) in Malesia e in Thailandia, e gli ospiti serbatoio sono sconosciuti, così come sono sconosciute malattie umane e animali legate a questo virus. Comunque, un'infezione sperimentale nei polli con il *virus Sitiawan*, un sottotipo di TMUV, ha portato ad encefalite e ritardo della crescita di questi animali (Kono et al., 2000; Shope, 2003).

Scheda 5: Gruppo virale Natya

Gruppo Spodweni

Il gruppo virale Spodweni include una sola specie virale, il *virus Zika*, tra cui si distinguono due sottotipi:

- Il *virus Zika* (ZIKV) è ampiamente distribuito in Africa e nel Sud Est Asiatico; è stato isolato da numerose specie di zanzare così come dalle scimmie, mentre gli uccelli non sembrano essere implicati nella trasmissione naturale del virus (Adam e Digoutte, 2005). Lo ZIKV è stato ripetutamente riconosciuto come responsabile di malattie umane, solitamente in piccoli focolai, l'ultimo dei quali registrato in Micronesia (Shope, 2003; Lanciotti et al., 2008; Hayes, 2009). I segni clinici includono febbre, cefalea, eczemi ed artralgia; i casi umani di infezioni da ZIKV potrebbero essere sottodiagnosticati poiché i segni clinici possono essere confusi con altre malattie più conosciute e diffuse come la Dengue o la Chikungunya. Malattie animali sono invece sconosciute (Adam e Digoutte, 2005).
- Il *virus Spodweni* (SPOV) sembra essere presente solamente in Africa, dove è stato isolato da varie specie di zanzare. Si sono verificati alcuni episodi di infezioni umane che si sono presentate con febbre, cefalea, mialgia ed eczemi; fino a adesso non sono stati identificati ospiti serbatoio animali (Adam e Digoutte, 2005).

Scheda 6: Gruppo virale Spodweni

Gruppo Febbre Gialla

Un importante gruppo virale appartenente ai *Flavivirus mosquito-borne* è il gruppo della Febbre Gialla. Il gruppo include 9 specie virali.

- Il virus *Banji* (BANV) è uno dei pochi *Flavivirus mosquito-borne* il cui primo isolamento è stato effettuato da un caso umano, dal sangue di un bambino Sudafricano che presentava febbre. Il virus è stato associato a un altro caso di malattia febbrile in Tanzania. Gli anticorpi neutralizzanti per questo virus sono però stati trovati anche nel siero umano di individui in Sudafrica, Mozambico, Angola, Namibia e Botswana. Il virus è stato isolato anche da un certo numero di gruppi di zanzare in differenti stati africani, ma anche da siero bovino, siero di alcuni piccoli roditori e da alcune talpe in Sudafrica, Mozambico, Zimbabwe e Kenya. Gli ospiti naturali del BANV sono probabilmente i roditori, e questo virus non è stato associato con alcuna malattia animale (Fulop et al., 1995; Shope, 2003; Adam e Digoutte, 2005).
- Il virus *Bouboui* (BOUV) è stato isolato per la prima volta da zanzare (*Anopheles paludis*) nella Repubblica dell'Africa Centrale. Più avanti sono stati effettuati con successo degli isolamenti da zanzare e varie specie di mammiferi in diversi stati Africani (Adam e Digoutte, 2005). Al momento non esistono informazioni disponibili riguardo alla patogenicità per l'uomo e per gli animali per questo virus.
- Il virus *Edge Hill* (EHV) è stato scoperto nel 1961 in zanzare della specie *Ochlerotatus vigilax* vicino a Cairns, in Australia. Il virus è stato isolato in più occasioni da questa stessa specie di zanzare, mentre meno frequentemente è stato isolato anche da zanzare di altre specie. Alcuni Wallaby, una specie di marsupiat, hanno mostrato possedere anticorpi neutralizzanti per questo virus, il che potrebbe significare che siano implicati nel ciclo di trasmissione naturale dell'EHV. C'è una singola indicazione di probabile infezione umana ad opera di questo virus, caratterizzata da mialgia, artrite ed affaticamento muscolare. Invece, malattie negli animali non sono mai state riportate (Shope, 2003).
- Il virus *Jugra* (JUGV) è stato isolato da varie specie di zanzare del genere *Aedes* in Malesia nel 1969. Non ci sono altre informazioni su isolamenti addizionali e non ci sono fonti che riportino informazioni sul ciclo di trasmissione o sulla patogenicità potenziale per ospiti a sangue caldo (Calisher e Gould, 2003).

- Il *virus Saboya* (SABV) si suddivide in due sottotipi, il *virus Potiskum* (POTV) e il *virus Saboya* (SABV).

Il SABV è stato isolato da numerose specie di zanzare, soprattutto in Senegal e nella Repubblica dell'Africa Centrale. Ci sono anche rari isolamenti virali da piccoli mammiferi, ma il virus non è mai stato isolato dagli uccelli. Malattie umane o animali causate da questo virus sono sconosciute (Adam e Digoutte, 2005).

Il POTV è stato isolato in Nigeria dal fegato di un ratto gigante (*Cricetomys gambianus*). Non ci sono isolamenti registrati da zanzare, né informazioni per quanto riguarda le malattie naturali in animali a sangue caldo (né nell'uomo) causate da questo virus (Omilabu et al., 1989).

- Il *virus Sepik* (SEPV) è stato isolato nel 1966 da *Mansonia septempunctata* e più tardi da altre specie di zanzare in Nuova Guinea. Esiste una probabile associazione con malattie umane, i cui sintomi sono febbre e cefalea; ospiti vertebrati non sono stati identificati e quindi non abbiamo indicazioni nemmeno di malattie negli animali (Shope, 2003).

- Il *virus Uganda S* (UGSV) è stato isolato da specie differenti di zanzare appartenenti al genere *Aedes* in Uganda. Alcuni altri isolamenti sono stati effettuati da varie specie di zanzare nell'Africa occidentale, ed è stato registrato un isolamento da un uccello ed uno dal sangue di un paziente umano che presentava febbre, in Tanzania, che non sono, comunque, confermati appieno (Adam e Digoutte, 2005); in generale, il virus non sembra essere patogeno per gli umani e per gli altri ospite a sangue caldo (Theiler e Downs, 1973).

- Il *virus Wesselsborn* (WESSV) è, in aggiunta a JEV, WNV, USUV e ITV, il quinto flavivirus mosquito-borne che causa malattie negli animali. Come nel caso di JEV e ITV, la viremia negli animali domestici (pecore, capre, bovini) ha un titolo sufficiente a infettare le zanzare.

Il WESSV è stato isolato per la prima volta nel 1955 da un agnello di otto giorni d'età durante un periodo in cui si erano verificati vari episodi di aborto e morte neonatale nel distretto di Wesselsbron, in Sudafrica (Swanepoel e Coetzer, 2004). Poco dopo, il virus è stato isolato da un uomo che presentava una malattia febbrile e da un gruppo di *Aedes circumluteolus* a Tongaland, in Sudafrica (Swanepoel e Coetzer, 2004). La presenza del virus da allora è stata documentata nei vertebrati e nelle zanzare in molti stati africani e anche in Thailandia (Shope, 2003; Swanepoel e Coetzer, 2004). Il virus è patogeno per gli agnelli neonati e per le pecore in gravidanza, e causa infezioni subcliniche in bovini, pecore, capre, suini ed equini. Negli agnelli la malattia è caratterizzata da febbre, anoressia e da debolezza generale con un tasso di mortalità che può

raggiungere il 27%.

Il fatto che l'attività del WESSV sia presente in aree dove sono rinvenute altre malattie con segni clinici simili (Febbre della valle del Rift, malattia delle pecore di Nairobi), fa sì che la malattia di Wesselsbron sia probabilmente sottostimata. Le infezioni umane compaiono sporadicamente e sono caratterizzate da febbre, cefalea, mialgia e artralgia (Karabatsos, 1985). Solitamente le persone sembrano essere infettate dalle zanzare, ma sono state descritte anche infezioni contratte in laboratorio o conseguenti al maneggiamento delle carcasse di animali infetti (Swanepoel e Coetzer, 2004).

- Il *virus della Febbre Gialla* (YFV) sembra essere il responsabile di oltre 200.000 casi clinici umani all'anno, con un tasso di mortalità approssimativo del 20% (Barrett e Monath, 2003).

La grande maggioranza dei casi avviene in Africa, ma il virus è attivo anche in Sudamerica: infatti, nonostante il virus sia originario del continente Africano, probabilmente è stato trasportato in Sudamerica durante i traffici di schiavi del 1600.

Il virus si mantiene in un ciclo comprendente le scimmie e varie specie di *Aedes* nelle foreste pluviali tropicali, sia in Africa che in Sudamerica. Gli esseri umani possono essere infettati accidentalmente (Febbre Gialla della Giungla). In ogni caso, il virus è introdotto periodicamente nelle aree urbane dove può creare delle epidemie tramite *Aedes aegypti* come vettore e gli esseri umani come ospiti serbatoi. Mentre molte specie di primati sembrano essere coinvolte nel ciclo di trasmissione mostrando infezioni subcliniche altre, come le Scimmie Urlatrici (del genere *Alouatta*), o il *Galato senegalensis* in Africa possono soccombere all'infezione del *Virus della Febbre Gialla*.

Scheda 7: Gruppo virale Febbre Gialla

GRUPPO ENCEFALITE GIAPPONESE

Virus Cacipacore

Il *virus Cacipacore* (CPCV) è stato isolato in una sola occasione da un Formichiere Mascherato (*Formicarius analis*) in Brasile; correlato filogeneticamente agli altri virus del gruppo encefalite giapponese, non è mai stato ritrovato in zanzare, né in altri ospiti vertebrati, uccelli o mammiferi; patologie legate alla presenza di questo virus sono pertanto sconosciute (Calisher e Gould, 2003).

Scheda 8: *Virus Cacipacore*

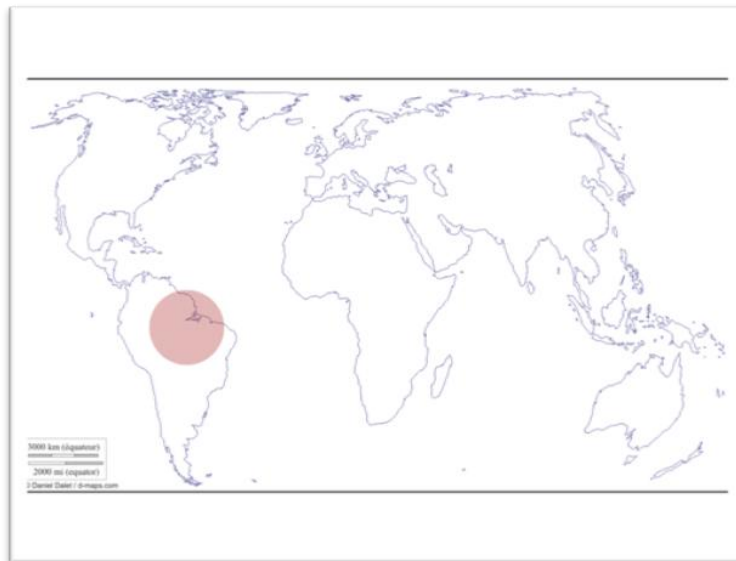


Figura 3: Distribuzione del *virus Cacipacore*

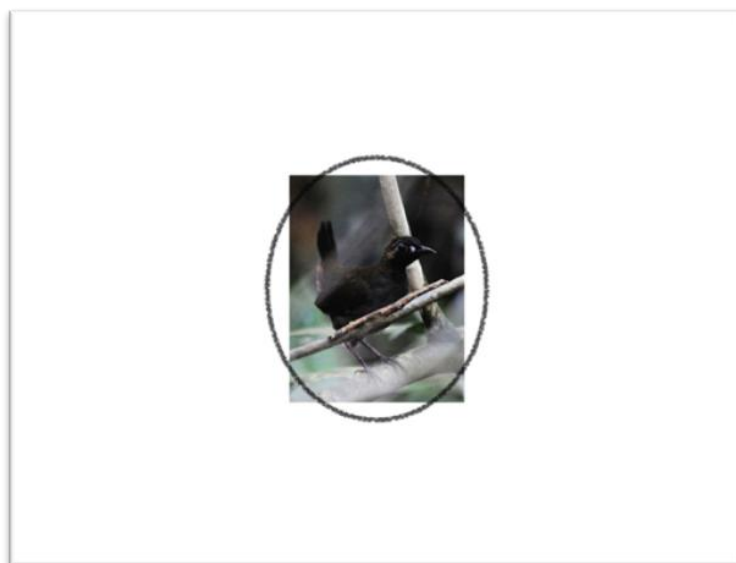


Figura 4: Epidemiologia del *virus Cacipacore*

Virus Encefalite Giapponese

Il virus *Encefalite Giapponese* (JEV) è un importante patogeno negli esseri umani tra i *Flavivirus mosquito-borne*. Ogni anno si riscontrano fino a 50.000 casi umani, con un tasso di mortalità approssimativamente del 25%. L'area di distribuzione principale di questo virus è l'Asia sud-est e l'Australia (WHO, 2007).

Il virus viene trasmesso da vettori, zanzare del genere *Culex*, soprattutto *Culex tritaeniorhincus* nelle aree endemiche, e gli ospiti serbatoio sono costituiti da uccelli selvatici (tra i quali quaglie, pernici, fagiani, anatre e folaghe), suini e cinghiali; in questi animali spesso la malattia è inapparente o comunque i sintomi sono molto lievi (episodi di aborto nelle scrofe).

Il virus può infettare anche altri ospiti a fondo cieco, tra cui il cavallo e l'uomo, dove la malattia può essere leggera, grave o, in alcuni casi, letale.

Esistono inoltre molti animali domestici e selvatici risultati sieropositivi al virus senza mostrare segni clinici, che possono svolgere la funzione di animali sentinella per la malattia: tra gli animali domestici i cani, i gatti e le capre, tra i selvatici i pipistrelli, i procioni e i cani procioni.

I primi focolai di JEV si sono verificati in Cina e in Giappone, e il primo isolamento è avvenuto in Giappone nel 1935 dall'uomo, seguito da un isolamento in Cina nel 1940. Da allora si sono avute diverse epidemie di questa malattia nei paesi del sud-est asiatico: la prima epidemia di grandi dimensioni è riportata in Repubblica di Corea nel 1949; seguita da altre come quella del Vietnam nel 1965, della Thailandia nel 1969, dell'India nel 1970, dello Sri Lanka nel 1985, del Pakistan nel 1992. Nel 2003 il virus ha raggiunto anche alcune isole australiane (Johansen et al., 2003).

Nel 1998 risultano sieropositivi al virus alcuni uccelli morti in Italia, animali in cui verrà ritrovato l'RNA virale poco dopo (Mani et al., 1998). In Italia sarà ritrovato l'RNA virale anche in zanzare del genere *Culex* nel 2012 (Ravanini et al., 2012).

Scheda 9: *Virus Encefalite Giapponese*

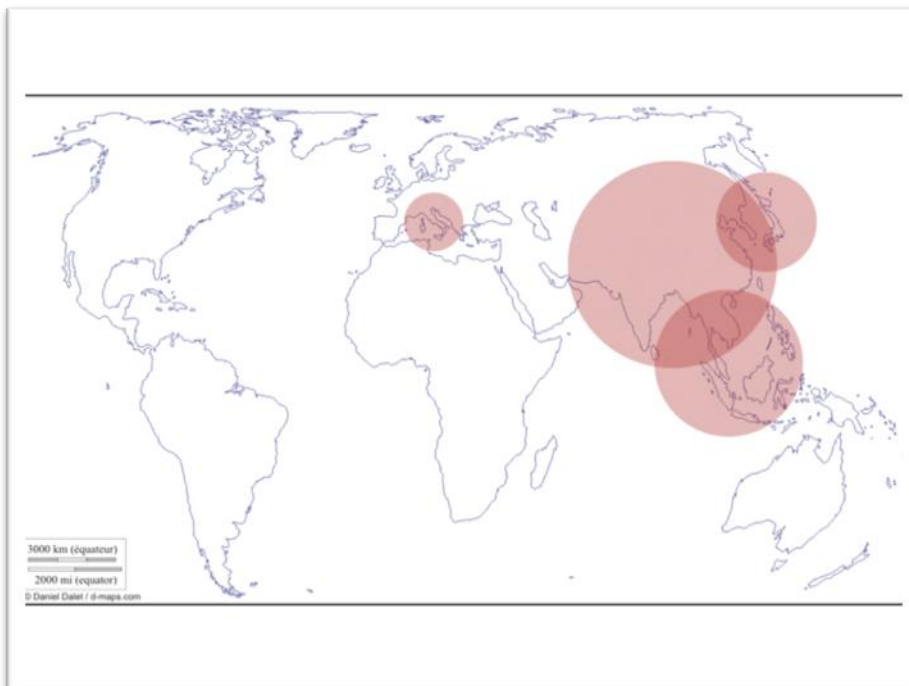


Figura 5: Distribuzione del virus *Encefalite Giapponese*

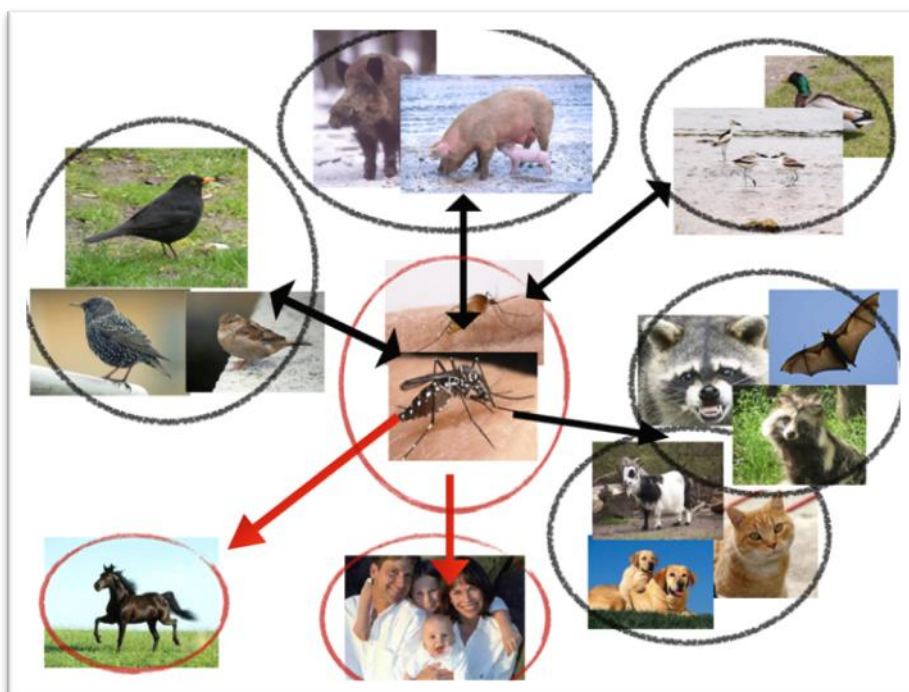


Figura 6: Epidemiologia del virus *Encefalite Giapponese*

Virus Koutango

Il *virus Koutango* (KOUV) è stato isolato per la prima volta da un roditore Africano (*Tatera kemp*) in Senegal e successivamente anche da roditori del genere *Mastomys* in paesi confinanti; inoltre è stato isolato dalla zanzara *Aedes aegypti*, che sembra essere il principale vettore della malattia. Fino ad oggi esiste un solo caso riportato di infezione umana caratterizzato da una leggera malattia febbrile, in un tecnico di laboratorio (Adam e Digoutte, 2005).

Scheda 10: *Virus Koutango*

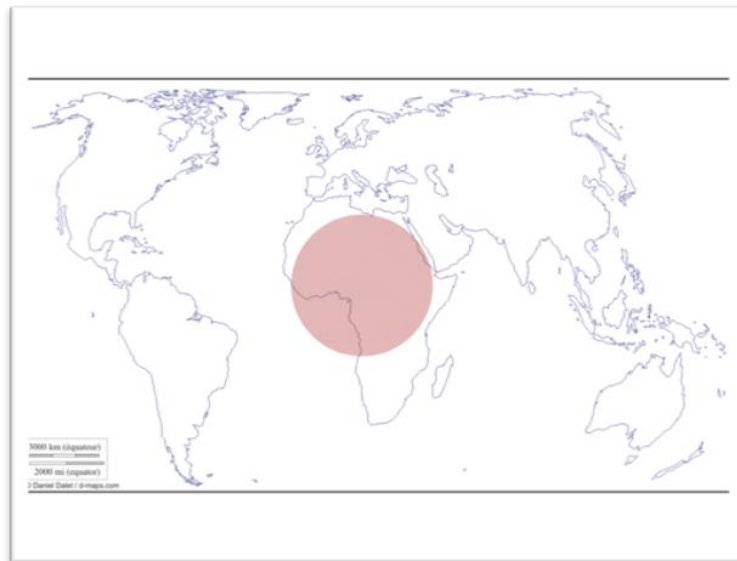


Figura 7: Distribuzione del *virus Koutango*

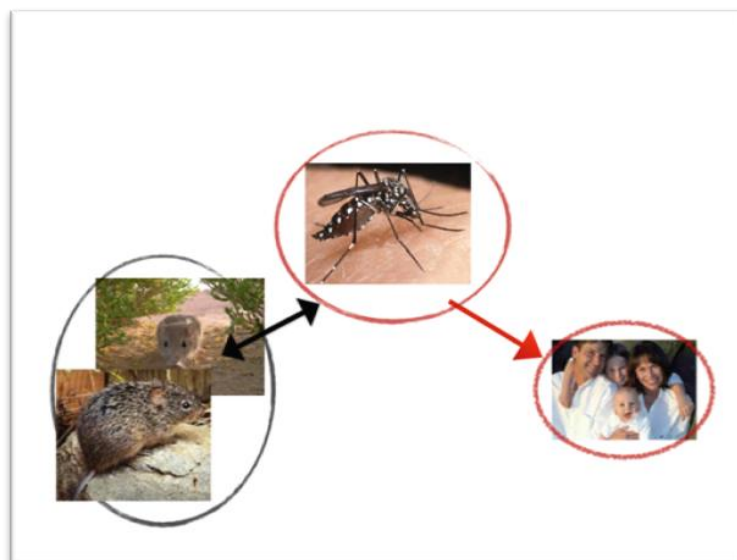


Figura 8: Epidemiologia del *virus Koutango*

Virus Encefalite Murray Valley

Il *virus Encefalite Murray Valley* (MVEV) è stato ritrovato in Australia e in Papua Nuova Guinea. Gli uccelli selvatici acquatici come cicogne e cormorani sono gli ospiti serbatoio del virus; i polli vengono utilizzati come animali sentinella nelle aree endemiche. Gli uccelli sono considerati i più importanti ospiti serbatoio, mentre il vettore principale è la zanzara di acqua dolce *Culex annulirostris*. Nessuna delle specie ospite mostra i segni della malattia (Russel e Dwyer, 2000) tranne l'uomo, per cui il virus risulta patogeno: l'ultima epidemia maggiore si è verificata nel 1974 in Australia, con 58 casi umani e un tasso di mortalità del 20%. Fin da allora sono stati riportati solamente casi sporadici (tra 1 e 15 all'anno).

Esiste un altro virus, il *virus Alfuy* (ALFV), ma in base a quanto detto dall'ICTV, questo virus è classificato come un sottotipo del MVEV, anche se alcuni dati più recenti suggeriscono una riclassificazione del virus come a sé stante nel gruppo encefalite giapponese (May et al., 2006). Questo virus è infatti stato isolato da un fagiano di palude (*Centropus phasianus*) ed è isolato regolarmente in Australia da zanzare del genere *Culex*. Tuttavia non ci sono malattie confermate nei vertebrati causate da questo virus (May et al., 2006).

Scheda 11: *Virus Encefalite Murray Valley*

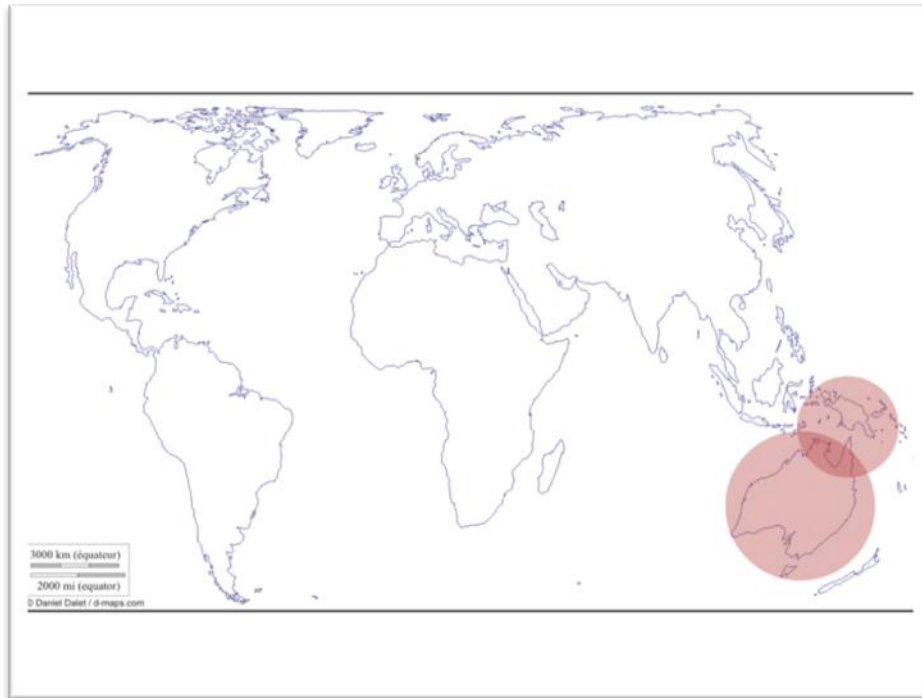


Figura 9: Distribuzione del virus *Encefalite Murray Valley*

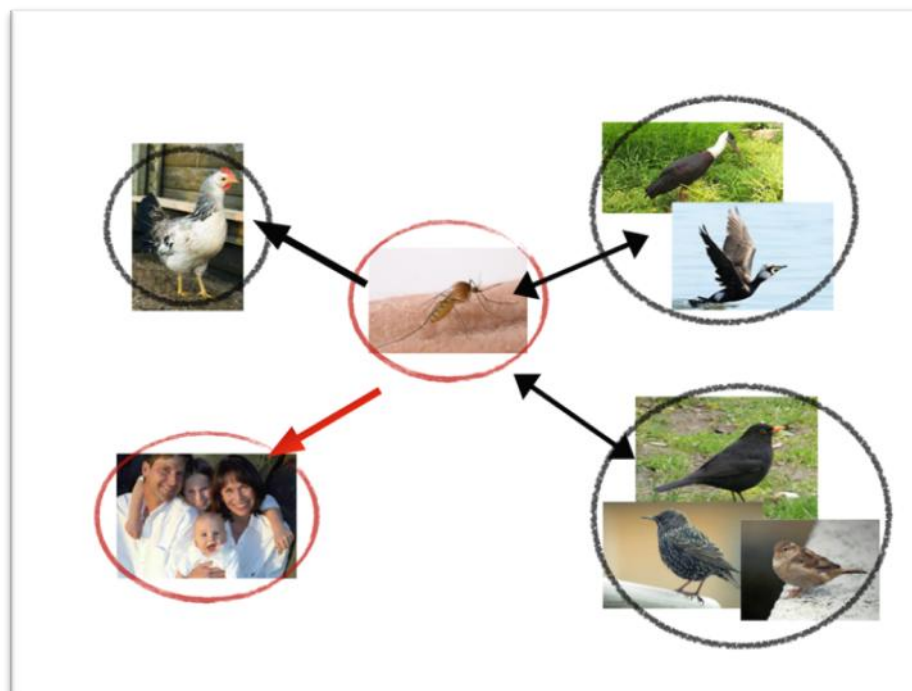


Figura 10: Epidemiologia del virus *Encefalite Murray Valley*

Virus Encefalite di St. Louis

Il virus *Encefalite di St. Louis* (SLEV) è distribuito nella maggior parte del continente americano. I principali ospiti sembrano essere uccelli appartenenti agli ordini dei Passeriformi e Columbiformi, mentre i principali vettori sembrano essere le zanzare del genere *Culex*. Tra gli ospiti vertebrati che possono essere infettati dal virus troviamo soprattutto uccelli, come il carpodaco messicano (*Carpodacus mexicanus*), tortora luttuosa (*Zenaidura macroura*), merlo tricolore (*Agelaius tricolor*), passero domestico (*Passer domesticus*), pettirosso americano (*Turdus migratorius*) e alcuni mammiferi come i Procioni (*Procyon lotor*) e i ratti del cotone (*Sigmodon hispidus*) (McLean e Bowen, 1980).

Durante gli ultimi 75 anni è stato riportato un grande numero di epidemie con centinaia di casi, ciascuno in diversi stati dell'America del Sud e dell'America Centrale. In totale sono stati stimati dal 1933 al 2000 più di 10.000 casi gravi, con più di 1000 decessi totali. L'ultima epidemia maggiore, registrata in Florida, ha avuto 222 casi umani confermati in laboratorio e 11 decessi nel 1990. L'Encefalite St. Louis endemica colpisce all'incirca 25 individui all'anno negli Stati Uniti. Gli uccelli selvatici infetti, così come i mammiferi (esclusi gli esseri umani) non mostrano segni clinici di malattia (Reisen, 2003).

Scheda 12: *Virus Encefalite di St. Louis*

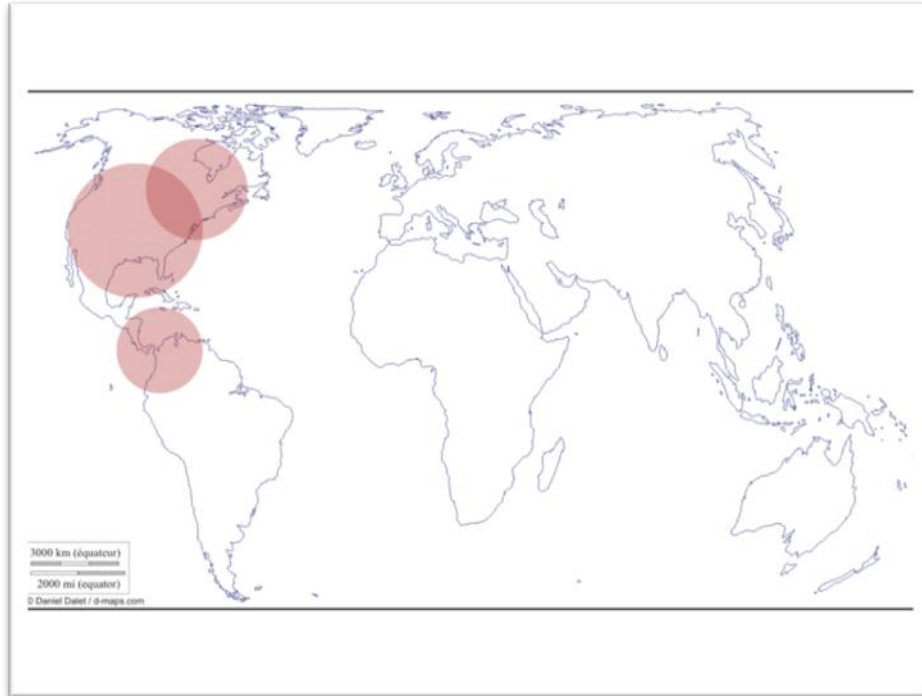


Figura 11: Distribuzione del virus *Encefalite di St. Louis*

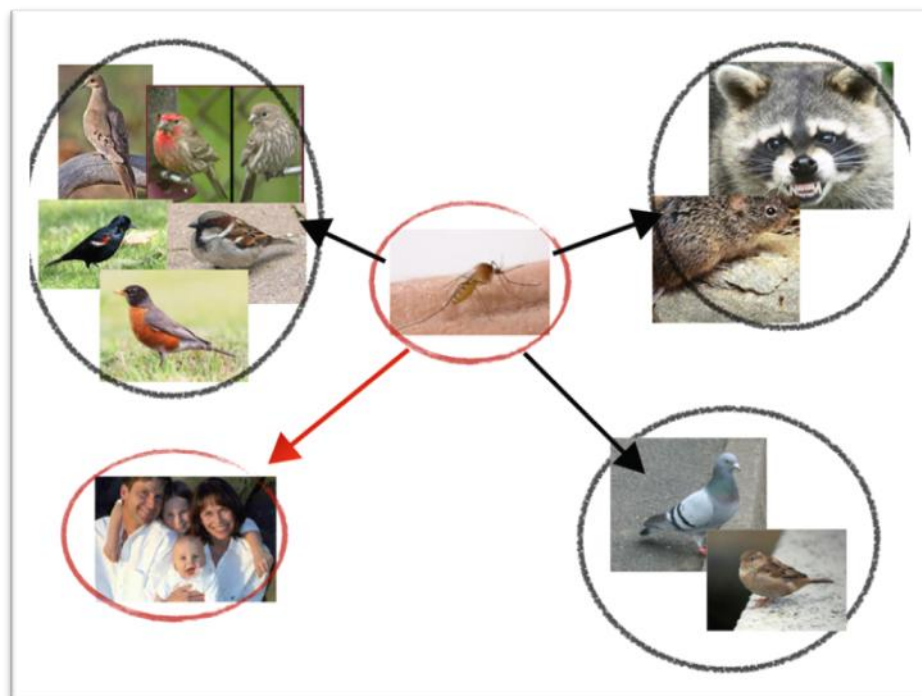


Figura 12: Epidemiologia del virus *Encefalite di St. Louis*

Virus Usutu

Il virus *Usutu*, USUV, è stato isolato originariamente da una zanzara della specie *Culex univittatus* nel 1959 in Sudafrica. Nei decenni successivi ceppi addizionali di Usutu sono stati isolati da specie diverse di zanzare e di uccelli in vari stati Africani (Adam e Digoutte, 2005). Nel 2001, tuttavia, è comparso nell'Europa Centrale un ceppo molto più virulento degli altri, che ha causato un'alta mortalità di uccelli, in particolare di merli (*Turdus merula*), ma anche in molte altre specie di uccelli, dopo il 2001 (Weissenböck et al., 2002; Bakonyi et al., 2007; Chvala et al., 2007). Questo ceppo di USUV è divenuto endemico nell'Europa centrale e la sua presenza è stata verificata in Austria, Ungheria, Svizzera e Italia; le zanzare del genere *Culex* sono considerate i principali vettori. La mortalità degli uccelli selvatici è calata ed è al momento solo riportata sporadicamente nelle aree endemiche. Alcuni animali sono risultati sieropositivi senza tuttavia rivelare segni clinici della malattia: tra questi i polli, i cavalli e gli asini, utilizzati come animali sentinella. Nel corso dell'anno 2009 in Italia si sono verificati due casi umani ricollegabili ad un'infezione da questo virus (Cavrini et al., 2009; Pecorari et al., 2009) e nel 2012 Ravanini et al. segnalano la presenza di tale virus in zanzare catturate nei pressi di Pontecchio Marconi e Pianoro (BO). Nel 2013 Weissenböck et al. in un'indagine retrospettiva riscontrano alla RT-PCR la presenza di USUV in tessuti e organi di merli morti nel 1996 in

Scheda 13: *Virus Usutu*

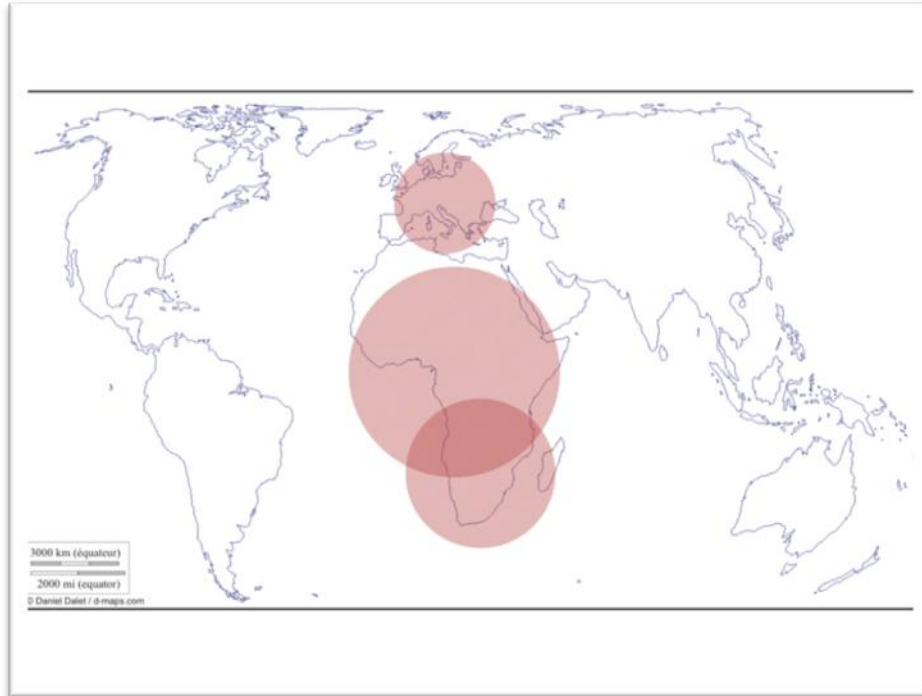


Figura 13: Distribuzione del *virus Usutu*

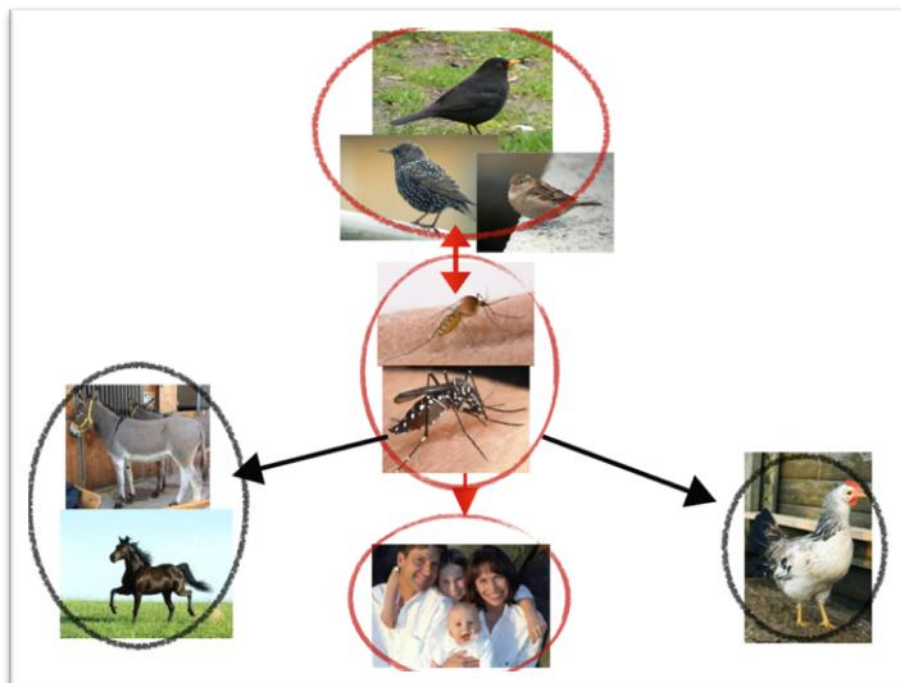


Figura 14: Epidemiologia del *virus Usutu*

Virus West Nile

Il *virus West Nile*, o WNV, è il virus dalla distribuzione geografica più ampia tra tutti i *Flavivirus mosquito-borne*. Il suo primo isolamento è datato 1937. La patogenicità di WNV rispetto a quella di altri *flaviviridae* come il DENV, YFV e JEV, molto patogeni, è considerata bassa.

In ogni caso, alcuni ceppi con genotipi più virulenti hanno iniziato ad emergere nell'anno 1996, causando epidemie in Romania, Israele, Russia, ed i casi più gravi si sono verificati con l'introduzione del virus in America, dove hanno causato una morbidità e una mortalità maggiore rispetto all'Europa. Nel 2002 Autorino et al. segnalano la presenza di WNV in Toscana nel 1998, in cavalli morti nei pressi del Padule di Fucecchio.

Le analisi sierologiche hanno dimostrato che è presente, in tutto il nostro continente, un certo grado (generalmente basso) di attività del virus.

Rispetto agli altri *Flavivirus mosquito-borne*, WNV è il più importante patogeno per quanto riguarda la medicina veterinaria. La sua patogenicità per i cavalli, nei quali induce una encefalomyelitis non suppurativa, è nota da molto tempo; negli Stati Uniti sono morti centinaia di cavalli a causa dell'infezione, mentre in Europa i casi equini sono concentrati in pochi focolai (Murgue et al., 2002); sporadicamente anche un certo numero di mammiferi sia selvatici che domestici ha sviluppato forme gravi di malattie encefaliche.

Scheda 14: *Virus West Nile*

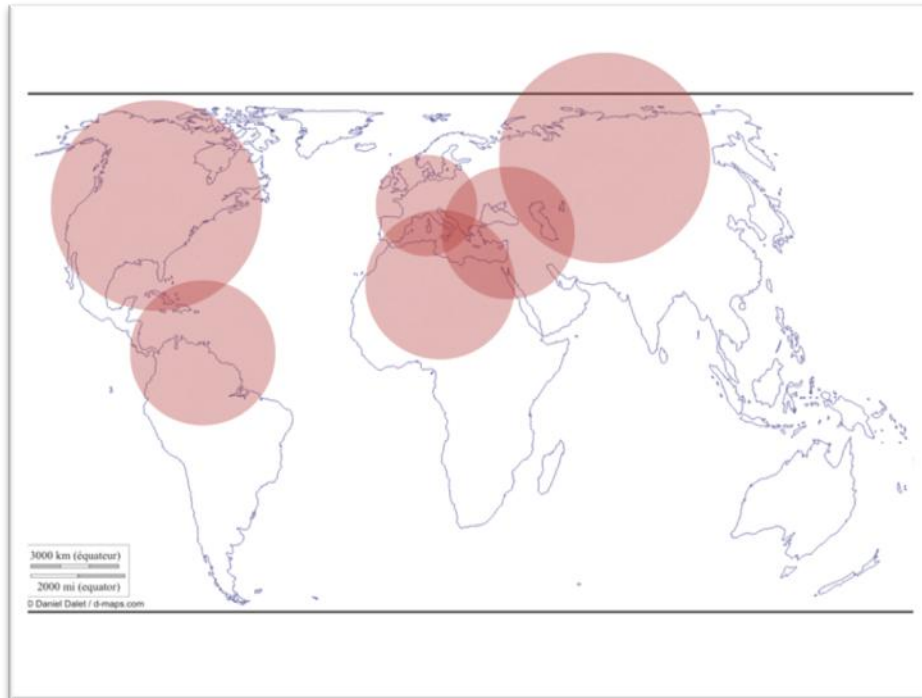


Figura 15: Distribuzione del *virus West Nile*

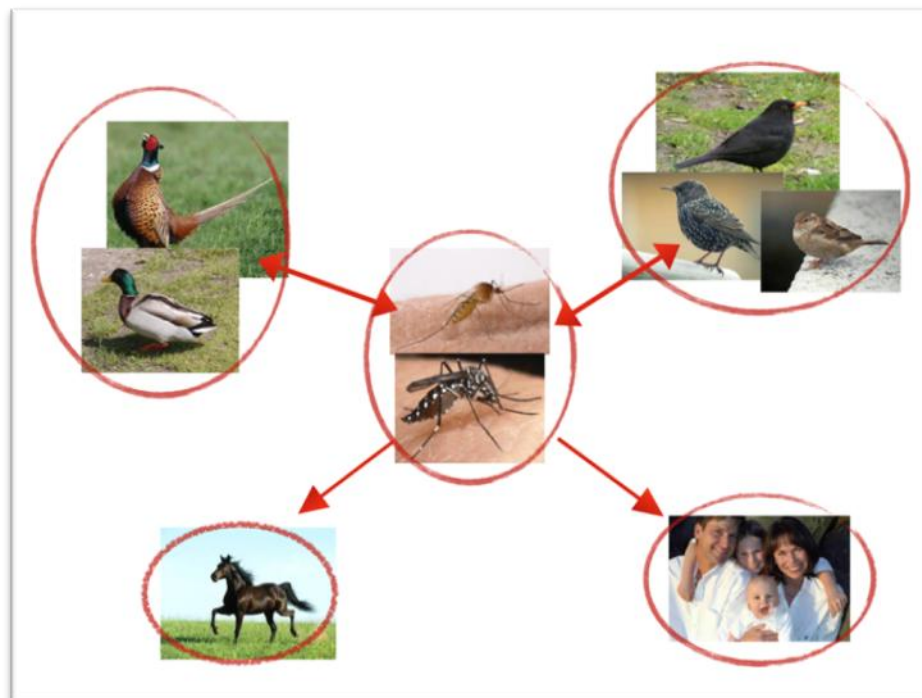


Figura 16: Epidemiologia del *virus West Nile*

Virus Yaounde

Il *virus Yaounde* (YAOUV) è stato isolato dalle zanzare *Culex Nebulosus*, da un uccello della specie *Bycanistes sharpii* e da vari roditori (appartenenti ai generi *Praomys* e *Cavia*) in vari paesi dell'Africa Sub-Sahariana; non ci sono informazioni, al momento, sulla possibile patogenicità per animali ed esseri umani, e nessun uomo al momento ha dimostrato essere sieropositivo al virus (Mackenzie et al., 2002; Adam e Digoutte, 2005).

Scheda 15: *Virus Yaounde*

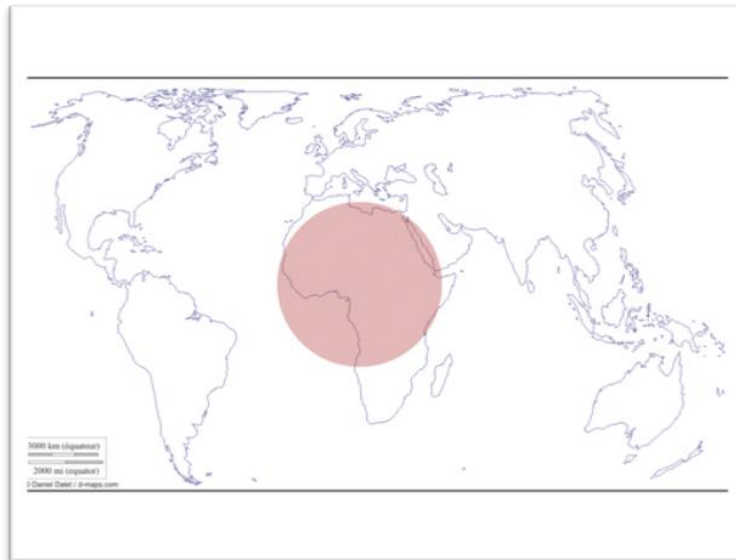


Figura 17: Distribuzione del *virus Yaounde*

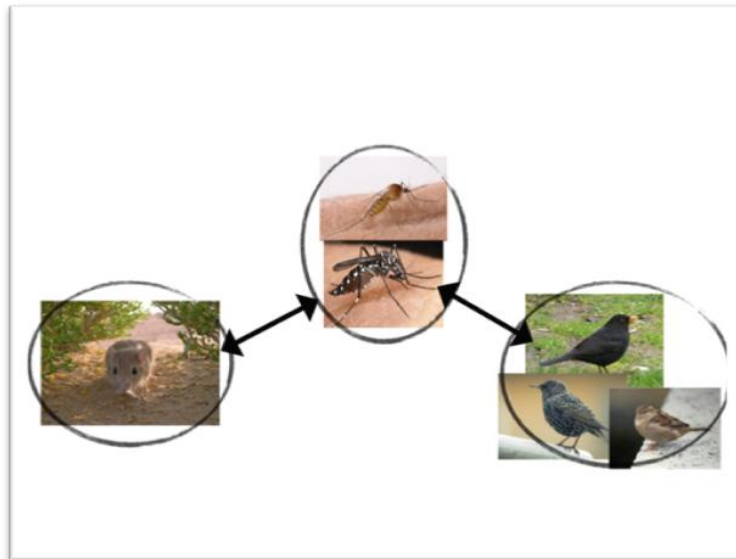


Figura 18: Epidemiologia del *virus Yaounde*

MONITORAGGIO SANITARIO IN TOSCANA

Nell'autunno 1996 si sono verificati, in un'area al confine fra le Province di Pistoia e Firenze, numerosi episodi di mortalità in passeriformi (Mani et al., 1998).

L'anamnesi riferiva che gli uccelli ritrovati morti o agonizzanti avevano presentato evidenti sintomi nervosi.

Fra il 5 Settembre 1996 ed il 13 Gennaio 1997 sono stati registrati complessivamente 51 passeriformi: 34 merli (*Turdus merula*); 8 tordi (*Turdus iliacus*); 5 storni (*Sturnus vulgaris*), 2 passeri (*Passer italiae*) e 2 tortore dal collare (*Streptopelia decaocto*).

Alla necropsia a buone condizioni generali corrispondevano lesioni macroscopiche e istologiche importanti caratterizzate da :

- lesione cutanea nell'area apterile addominale (compresa fra la cicatrice onfalica e la cloaca) costituita da una o più escare confluenti particolarmente estese ed evidenti in giovani merli;
- Splenomegalia;
- Focolai di necrosi multipli a miocardio, rene e pancreas;
- Diffuse emorragie a livello meningeo.



Figura 19: Fase di raccolta del materiale patologico al momento della necropsia.

L'esame istologico ha evidenziato lieve/moderato infiltrato infiammatorio, caratterizzato da linfociti, plasmacellule e macrofagi in milza, miocardio, rene e pancreas e diffuse microemorragie, infiltrati mononucleati a livello sub-meningeo, manicotti perivascolari e gliosi generalizzata nel SNC. Inoltre è stata rilevata dermatite necrotica di tipo cronico attivo caratterizzata da profonda vacuolizzazione per lisi delle cellule dello stato basale dell'epidermide e da notevole infiltrazione dermica da parte di elementi mono e polimorfonucleati a partire dalle aree perivascolari. La colorazione con metodo PAS ha permesso di osservare in alcuni casi ife fungine infiltrate nelle aree cribrate e lese dell'epidermide.

All'esame immunoistochimico con anticorpo monoclonale diretto contro proteine capsidiche dei *Flavivirus* del gruppo encefalite giapponese (JE group), il materiale patologico è risultato positivo, in particolare a livello di:

- cellule acinari e dell'infiltrato infiammatorio del pancreas;
- fibre miocardiche;
- cellule epiteliali dei tubuli renali;
- un elevato numero di cellule mieloidi del midollo osseo;
- neuroni corticali, cellule gliali ed endoteliali nel SNC.

Fra il 2001 e il 2003 sono stati inviati al Central Research Institute of Epidemiology di Mosca 14 campioni di tessuti fissati in formalina al 10% relativi all'episodio sopra riportato; nel 2012 33 campioni relativi allo stesso episodio sono stati inviati all'Institute of Pathology and Forensic Veterinary Medicine di Vienna.

Dal documento di risposta all'invio dei materiali nel 2003 (Platonov, 2004) si riporta:

“A. L'accertata metodica RT-PCR ha evidenziato la presenza di RNA flavivirale in differenti tessuti (rene o/o cuore e/o milza e/o cervello) di sei uccelli.

B. Nessun campione è risultato positivo con le due metodiche RT-PCR specifiche per il gene E di WNV.

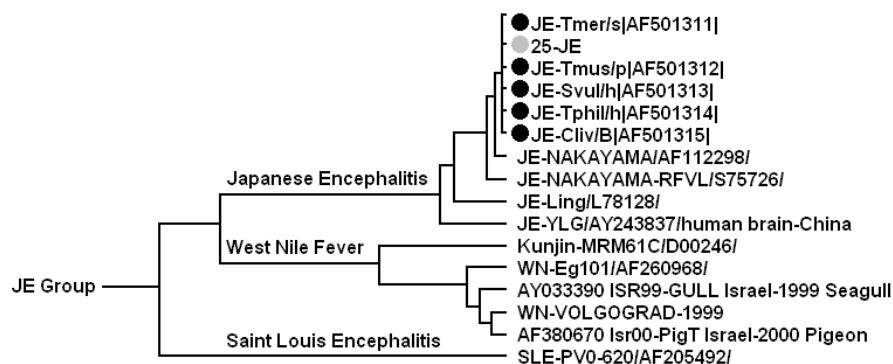
C. L'amplificazione del NS5 ottenute da due uccelli sono state sottoposte a sequenziamento diretto e confrontate con un GeneBank data disponibile. La massima omologia è stata osservata con il virus dell'Encefalite Giapponese (JEV), ceppo Ling, ACCESSION L78128) [...], mentre l'omologia con genoma non-JEV era meno dell'80%.

#Italy_birds_NS5-3.2-4.1

*CACGGTATCTAGAGTTTGAAGCTTTGGGGTTCCTGAATGAAGAC
CATTGGCTGAGCCGAGAGAANTCAGGAGGTGGAGTGGAAAGGCT
CGGGCGTCCAAAAGCTAGGATACATCCTCCGTGACATAGCAGGA
AAGCAAGGAGGGGAAAATGT*

D. Quando i campioni di tessuto di uccello sono stati esaminati con l'RT-PCR specifica per il gene E di JEV, i risultati positivi sono stati ottenuti dagli stessi 6 uccelli.

E. I frammenti amplificati del gene E di 552 nucleotidi provenienti dal RNA estratto da 5 uccelli erano pressoché identici a JEV, ceppo NAKAYAMA, AF112298 (differenze di 1-3 nucleotidi e 1 amminoacido) mentre l'omologia con il genoma non-JEV era meno del 70%.



F. Risultati schematizzati in tabella:

| Specie | Tessuto positivo in IHC | Tessuto analizzato in biologia molecolare | Antigene flavivirale NSS | Sequenziamento NSS | Gene E WN specifico | Gene E JE specifico | Sequenziamento gene E |
|--------------------------|-------------------------|---|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| <i>Turdus merula</i> | M, P, Bm, S | milza | pos | non effettuato | neg | pos | compatibile con JEV |
| <i>Turdus merula</i> | M, P, Bm | pancreas | pos | compatibile con JEV | neg | pos | compatibile con JEV |
| <i>Sturnus vulgaris</i> | M, K, Bm | cuore | pos | non effettuato | neg | pos | compatibile con JEV |
| <i>Turdus musicus</i> | M, P | cuore | pos | compatibile con JEV | neg | pos | compatibile con JEV |
| <i>Turdus musicus</i> | M, P, Br | cervello | pos | non effettuato | neg | pos | non effettuato |
| <i>Sturnus vulgaris</i> | P, K, Br | cervello | neg | non effettuato | neg | neg | non effettuato |
| <i>Passer domesticus</i> | M, Br, Bm | cervello | pos | non effettuato | neg | pos | compatibile con JEV |

M= miocardio, K= rene, Bm= midollo osseo, Br= cervello, P= pancreas, S= milza

G. Quando i campioni di tessuto degli uccelli raccolti nel 1997 sono stati analizzati con l'RT-PCR specifica per il gene E di JEV, si è ottenuto un risultato positivo solo in 1 uccello (passero) su 14. La concentrazione dell'RNA di JE era di poco superiore al limite di rilevamento di questo metodo. Il metodo specifico per NS5 ha dato risultati negativi perché questo metodo aveva limiti di rilevamento peggiori rispetto al metodo specifico per JE. L'RT-PCR specifica per WNV ha dato risultati negativi.

Siamo stati in grado di sequenziare l'amplificazione ottenuta dal metodo specifico per JE-gene E. La sequenza aveva di nuovo il 99% di omologia con JEV, ceppo Nakayama, AF112298 (3 sostituzioni su 592 nucleotidi).

CCACTTGCTGAGGTCAGAAGTTACTGCTATCATGCTTCAGTCACT
GACATTTTCGACGGTGGCTCGGTGCCCCACGACTGGAGAAGCTCA
CAACAAGAAGCGAGCTGATAGTAGCTATGTGTGCAAACAAGGCT
TCACTGATCGTGGGTGGGGCAACGGATGTGGACTTTTCGGGAAG
GGAAGCATTGACACATGTGCAAAATTCTCCTGCACCAGTAAGGC
GATTGGGAGAACAAATCCAGCCAGAAAACATCAAATACGAAGTTG
GCATTTTGTGCATGGAACCACTTCGGAAAACCATGGGAATTA
TTCACGCGCAAGTTGGGGCGTCCCAGGCGGCAAAGTTTACAGTA
ACACCCAATGCTCCTTCGATAACCTCAAACCTTGGTGACTACGGA
GAAGTCACACTGGACTGTGAGCCAAGGAGTGGACTAAACACTGA
ACCGTTTTACGTCATGACCGTGGGGTCAAAGTCATTTTTGGTCCA
CAGGGAATGGTTTCATGATCTCGCTCTCCCTTGGACGCCCCCTTC
GAGCACAGCGTGGAGAAACAGAGAACTCCTCATGGAATTTGAAG
AGGCGCACGCCACAAAA

H. Il basso numero di positività nei campioni raccolti nel 1997 ed esaminati nel 2003 non è sorprendente, perché l'RNA virale doveva essersi parzialmente degradato durante la lunga conservazione in formalina. Comunque, l'alta somiglianza della sequenza JE ottenuta dai campioni di tessuto aviare raccolti nel 1997 e nel 2001 è molto importante. In primo luogo dimostra la circolazione da lungo tempo di JE virus in una parte della popolazione aviare. Secondo, questa è un'indicazione in più che i nostri risultati non possono essere causati da una contaminazione, almeno da contaminazione nel nostro istituto. Stiamo ricercando la presenza di RNA flavivirale in centinaia di campioni aviari ogni anno utilizzando le stesse metodiche. Comunque l'RNA di JE è stato trovato solo nel 2001 e nel 2003 quando abbiamo esaminato i

campioni mandati dal Dr. Rossi. Allo stesso tempo nel nostro istituto non è stato approntato nessun lavoro con colture virali.

4) I nostri risultati rappresenterebbero il primo rilevamento di un'infezione zoonosica, non importata, da JEV in Europa. La potenziale emergenza dell'introduzione di JEV può essere a malapena sovrastimata.

*5) Chiaramente questi risultati non rientrano nel contesto della patologia da West Nile, e di conseguenza non rientrano nel Programma Nazionale del Monitoraggio della West Nile Fever (O.M. 113 del 16/5/2012) perché è stata evidenziata la presenza di un altro Flavivirus, chiamato Virus dell'Encefalite Giapponese. Il Central Institute of Epidemiology, in accordo con il Dr. Rossi, intende pubblicare presto questi dati di pubblica importanza in una rivista internazionale per la considerazione della comunità scientifica. lo studio sarà considerato retrospettivo perché i campioni sono stati raccolti tra il 1997 e il 2001.”**

*Nel documento di risposta riportato e tradotto dall'inglese le date si riferiscono all'invio dei campioni, tutti raccolti nel 1996/97 da merli e altri passeriformi.

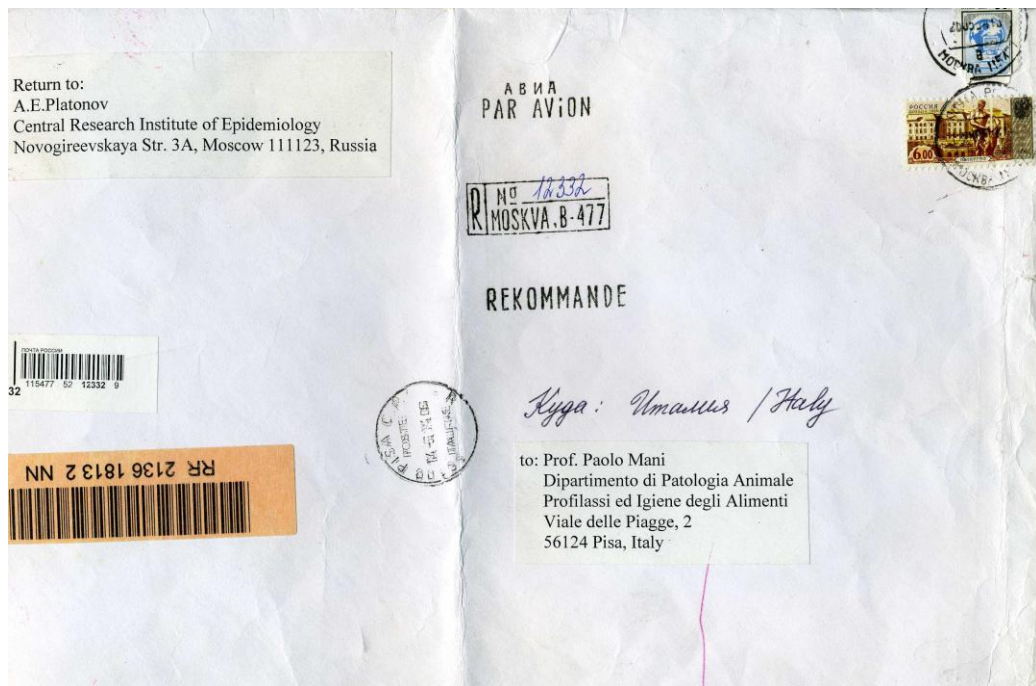


Figura 20: Lettera di risposta del 2004 del Prof. Platonov all'invio dei materiali

-- Bib: PLATONOV A.E. : Documento di risposta ad
esami RT-PCR su tessuti di
uccelli ~~scaduti~~ morti in
epidemia 1996-97 raccolti
nel Laboratorio di Patologia
Anz. delle Facoltà di
Vet. di Pisa.

To: Centro di Referenza Nazionale per le
Malattie Esotiche
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
Dell'Abruzzo e del Molise
Campo Boario 1
64100 Teramo, Italy

Copy to: Ministero della Salute
Direzione Generale della Sanità Pubblica Veterinaria
Alimenti e Nutrizione, Ufficio VII
Pal. Italia EUR- P.le Marconi, 25
00144 Roma, Italy

Copy to: Direttore del Dipartimento di Scienze Veterinarie
Via Circonvallazione 93/95
62024 Matelica (MC), Italy

Copy to: Prof. Paolo Mani
Dipartimento di Patologia Animale
Profilassi ed Igiene degli Alimenti
Viale delle Piagge, 2
56124 Pisa, Italy

Object: Communication on scientific results and laboratory methods

In reference to the letter dated 16 July 2002, prot. N° 600-7/24461/12/605 from the Italian Ministry of Health (a copy is enclosed as "Attachment 1"), on behalf of the Central Research Institute of Epidemiology, Russian Ministry of Public Health, Moscow, Russia, I report to the Istituto Zooprofilattico Sperimentale Dell'Abruzzo e del Molise the following:

- 1) In 2001 we have received from Dr.G.Rossi the 10% buffered formalin-fixed avian tissue samples collected by Dr. Rossi while he was working in the Department of Animal Pathology, Prophylaxis and Food Hygiene of the University of Pisa. We have received also the formalin fixed tissues from other birds which had died in 1997; the samples were sent to us by Prof. Paolo Mani and Dr. Rossi of the same Department in March, 2002.
- 2) **Our methods were the following:**
 - A. The standard acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction method (Chomezynski & Sacci 1987) for the RNA extraction from tissue samples.

Figura 21: Prima pagina del documento di risposta del Prof. Platonov da Mosca

A partire dall'episodio del 1996, il monitoraggio sanitario per virus del gruppo encefalite giapponese ha previsto controlli su uccelli rinvenuti morti in Toscana.

Presso il laboratorio di Patologia Aviare del Dipartimento di Patologia Animale Profilassi e Igiene degli Alimenti della Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa, gli animali recapitati ed i materiali raccolti sono stati registrati su una scheda con numero di riferimento progressivo nella quale sono stati riportati data, provenienza, numero, specie, sesso, età e data di ritrovamento. Vengono inoltre annotate informazioni e/o dati anamnestici. Tali dati sono stati quindi trasferiti su un foglio di calcolo per successive analisi ed elaborazione dati.

Dal 1997 ad oggi sono stati registrati 2660 uccelli selvatici che, provengono:

- 910 dal Centro Regionale Recupero Fauna Selvatica della Toscana c/o Centro Scienze Naturali di Galceti (Prato);
- 513 dal Centro Recupero Uccelli Marini e Acquatici (CRUMA) di Livorno;
- 635 da Parchi Naturali o aree faunistiche protette;
- 602 da privati o allevatori, recapitati direttamente al laboratorio.

La necropsia, previa valutazione di stato di conservazione della carcassa e presenza di lesioni esterne, ha previsto controlli mirati all'individuazione delle lesioni caratteristiche di patologie causate da virus del gruppo encefalite giapponese quali l'escara addominale, potenziale porta di ingresso del virus, e i quadri congestizio emorragici a carico di Sistema Nervoso Centrale, fegato e milza.



Figura 22: Partita di uccelli selvatici inviati dal centro di recupero di Galceti (PO); ad ogni animale era allegata una scheda di rilevamento



Figura 23: Storni e passeri rinvenuti morti nell'Area di Studio nel parco naturale di Migliarino San Rossore Massaciuccoli nel 2000 (NR 359/2000)

Dopo alcuni anni la costante negatività dei controlli necroscopici ha suggerito di verificare la presenza di JE Group virus tramite test di screening sierologico su popolazioni potenzialmente recettive. A tale scopo è stato utilizzato come antigene ID Screen® West Nile Competition Screening test, ID VET, Montpellier.

I primi controlli hanno riguardato la selvaggina di allevamento vista la loro presenza sul territorio. Sono stati effettuati prelievi di sangue in riproduttori di 8 Centri di Produzione di Selvaggina (CPS) della Toscana, 7 di fagiano ed 1 di pernice.

La scelta è stata effettuata previa valutazione di fattori di rischio epidemiologico (FRE) quali:

- 1) Localizzazione in area o in prossimità di area dove sono stati segnalati gli episodi del 1996 e del 1998 rispettivamente sostenuti da JEV e WNV;
- 2) Localizzazione in area favorevole per presenza dei vettori;
- 3) Presenza in allevamento di avifauna selvatica recettiva;
- 4) Presenza di altri avicoli di allevamento recettivi;
- 5) Presenza nei dintorni del CPS di suini;
- 6) Presenza nei dintorni dell'allevamento di altri mammiferi recettivi a JE Group virus.

Complessivamente sono stati esaminati 270 sieri raccolti nella Regione Toscana.

| Allevamento | Specie | Provincia | FRE | Anni | | | | | |
|-------------|--------|-----------|------------------|-------------|------|------|------|------|-------------|
| Migliarino | F | PI | 2,3,4,5,6 | 1999 | 2002 | 2003 | 2004 | 2006 | 2007 |
| Fucecchio | F | PI | 1,2,3,4,6 | 1999 | 2002 | 2003 | 2004 | / | / |
| Le Pianora | F | PI | 1,2,3,4,6 | / | 2002 | 2003 | 2004 | / | / |
| Aulla | F | MS | 3,4 | / | / | 2003 | 2004 | / | / |
| Montaione1 | F | FI | 3,4 | / | / | 2003 | 2004 | / | / |
| Montaione2 | F | FI | 3,4 | / | / | 2003 | 2004 | / | / |
| Cedri | F | PI | 3,5 | / | / | 2003 | 2004 | / | / |
| Scarlino | Pe | LI | 2,3 | / | / | / | / | / | 2007 |

Tabella 1: risultati del controllo sierologico su fagiani. In rosso gli allevamenti in cui sono state riscontrate positività.

Il CPS risultato positivo è sito all'interno del Parco naturale regionale di Migliarino San Rossore Massaciuccoli e presenta 5 FRE su 6, (non presenta il FRE n° 1), essendo situato a circa 50 Km dall'area dove nel 1996 è stato segnalato JEV e nel 1998 WNV.

Per quanto riguarda gli altri:

- FRE 2: *l'allevamento è sito in area favorevole alle zanzare, responsabili nell'area di altre malattie trasmesse da tali vettori quali la mixomatosi nel coniglio selvatico e la microfilariosi in uccelli selvatici;*
- FRE 3: *nell'allevamento è presente avifauna selvatica recettiva. Alcune voliere particolarmente ricche di vegetazione sono infatti dormitorio stabile per passeri e temporaneo per altri piccoli passeriformi migratori;*
- FRE 4: *all'interno dell'allevamento è presente un pollaio con galline, anatre, tacchini e pavoni e nidificano stabilmente alcune coppie di piccioni;*
- FRE 5: *all'esterno del recinto è presente il cinghiale (Sus scrofa). Il CPS si trova infatti all'interno del Parco Naturale Migliarino San Rossore Massaciuccoli dove il cinghiale raggiunge una notevole densità di popolazione;*
- FRE 6: *l'allevamento confina con un centro ippico dove sono presenti fattrici, stalloni e puledri.*

La positività in fagiani del CPS di Migliarino ha suggerito di orientare i successivi controlli su un'area di studio più limitata, il Parco Naturale di Migliarino San Rossore Massaciuccoli, e su specie di interesse epidemiologico e di grande presenza nell'area del Parco.

Per questo motivo sono state analizzate nel corso degli anni 2008 e 2009 delle anatre utilizzate come richiami vivi in Appostamento Fisso di Caccia agli Acquatici (AFCA).

Le anatre erano esposte al contagio durante l'attività venatoria (da Settembre a Gennaio) in area a rischio per la presenza di uccelli acquatici selvatici e cinghiali, oltre che per la vicinanza al CPS di Migliarino (circa 1500 metri in linea d'aria). Nella tabella sono riportati i risultati delle analisi.

| | Anatre da richiamo | | |
|-------------------------|--------------------|----------|------|
| | Esaminati | Positivi | % |
| 1° prelievo 06/02/09 | 9 adulti | 3 | 33,3 |
| 2° prelievo 08/06/08 | 9 giovani | 0 | 0 |
| | 12 adulti | 4 | 33,3 |
| 3° prelievo 21/07/09 | 21 giovani | 0 | 0 |
| 4° prelievo 02/10/09 | 12 giovani | 0 | 0 |
| Totale | 63 | 7 | 11,1 |

Tabella 2: Risultati del controllo sierologico sulle anatre utilizzate in AFCA.

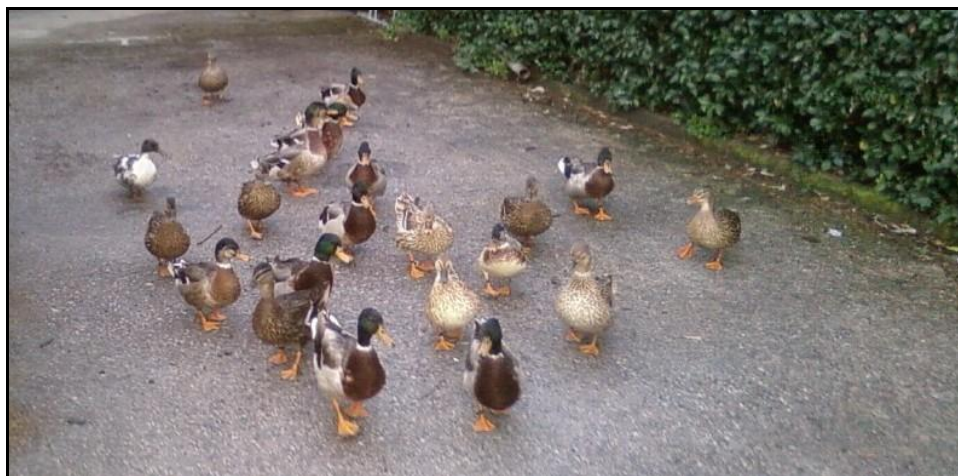


Figura 24: Prelievo del 6/2/09 in anatre di ritorno dall'AFCA



Figura 25: Prelievo del 21/7/09 da riproduttori e giovani prima di essere condotti all'AFCA

La positività in fagiani e anatre da richiamo ha suggerito di estendere lo screening sierologico al cinghiale. Censimenti periodici stimano in circa 5 animali per Km² la densità di popolazione del cinghiale nel Parco (Filogari et al., 2009): nella tabella sono riportati i risultati delle analisi sierologiche.

| | Cinghiali | | |
|--------|-----------|----------|------|
| | Esaminati | Positivi | % |
| 2008 | 18 | 13 | 72,2 |
| 2009 | 30 | 11 | 36,7 |
| Totale | 48 | 24 | 50 |

Tabella 3: Risultati del controllo sierologico su cinghiali nel Parco



Figura 26: Gabbia di cattura dei cinghiali sita all'interno del Parco



Figura 27: Prelievi di campioni di sangue in cinghiali nel Parco

Dai risultati emerge che nel 2008 su animali adulti di diversa età catturati nel periodo autunno-invernale la positività raggiunge il 72,2% e nel 2009 fra gli 11 risultati positivi 3 erano soggetti giovani nati nell'anno.

Sono stati inoltre esaminati 11 cavalli ed un asino. Un cavallo, allevato in un recinto a circa 200 metri di distanza dalle voliere dei fagiani del CPS di Migliarino, è risultato positivo a test ELISA a due prelievi successivi eseguiti a distanza di 3 mesi uno dall'altro, mentre l'asino è risultato dubbio allo stesso test.

Nel Gennaio 2010 n°46 sieri, di cui 17 positivi (2 di cavallo, 7 di anatra e 8 di cinghiale) e 29 negativi a test di screening (10 di cavallo, 1 di asino, 10 di anatra e 8 di cinghiale) sono stati inviati al CESME presso l'IZS di Teramo dove sono stati sottoposti a standard test di sieroneutralizzazione per WNV e USUV e a test ELISA competitivo per JE Group virus.

Il Centro ha comunicato i seguenti risultati:

- Tutti i sieri esaminati di cinghiale, anatra e cavallo sono risultati negativi a SN per WNV;
- N° 2 sieri di anatra sono positivi a titolo 1:5 e 1:10 per USUV.
- Al test ELISA competitivo sono confermate le positività e le negatività dei sieri di cavallo e anatra esaminati.

Le prevalenze rilevate ai test di screening in popolazioni recettive hanno quindi permesso di confermare l'ipotesi della diffusione di JE Group virus nell'area di studio nel Parco Naturale Migliarino San Rossore Massaciuccoli ed è per tale ragione che nella fase successiva l'attenzione è stata concentrata sulla ricerca dei virus nei vettori.

AREA DI STUDIO

Il sito d'importanza comunitaria (SIC) “Selva Pisana” ricade all'interno del Parco Naturale di Migliarino San Rossore Massaciuccoli, comprende il Lago e la palude di Massaciuccoli e si estende nella fascia costiera che va dalla periferia di Viareggio fino a quella di Livorno. Il SIC è situato in provincia di Pisa, comprende i comuni di Vecchiano, San Giuliano Terme e Pisa ed ha un'altitudine compresa tra 0 e 2 m sopra al livello del mare. La superficie di estensione è di 9.658 ettari.

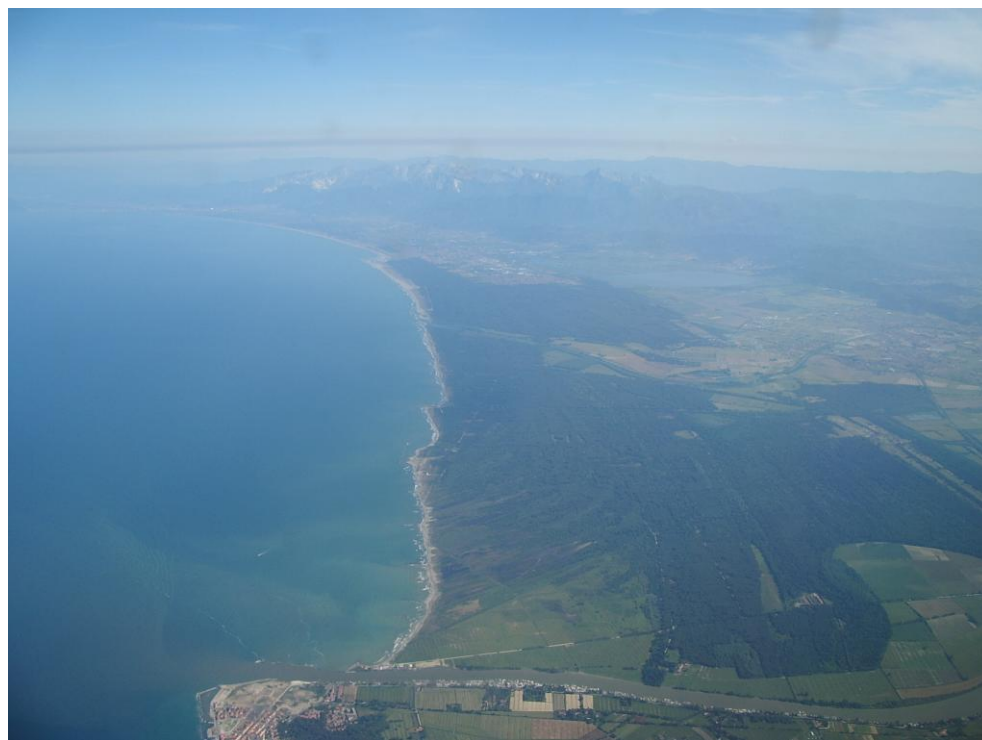


Figura 28: Vista aerea del SIC “Selva Pisana”

Il Parco fu istituito nel 1979 con la finalità di proteggere gli importanti valori naturalistici presenti al suo interno, pur inseriti in un contesto territoriale a carattere fortemente antropizzato.

Troviamo un habitat costituito da zone umide frammiste a boschi planiziali, formazioni dunali e aree coltivate ricavate prevalentemente da zone bonificate. Sono comprese nell'area di studio le selve di San Rossore, Coltano, Migliarino, Tombolo e la Macchia Lucchese. Il

territorio comprende le foci dei fiumi Arno e Serchio e dei canali Arnaccio e Fiume Morto che convogliano al mare parte delle acque raccolte nei canali di bonifica. L'attuale copertura boschiva è data dalla compresenza di formazioni sia naturali che di origine antropica, che si sviluppano su terreni con differente grado di umidità, assicurando un elevato livello complessivo di diversità ambientale e biologica.



Figura 29: Foce del Fiume Morto all'interno del Parco

In aree più asciutte, chiamate dune o tomboli (o cotoni), che si riconoscono fino a 5 Km dall'attuale linea di costa, e allineate a formare piccoli rilievi collinari, si sviluppano boschi di sclerofille mediterranee caratterizzate dalla presenza di leccio (*Quercus ilex*), pino marittimo (*Pinus pinaster*) nelle aree più vicine alla costa e pino domestico (*Pinus pinea*) nelle fasce più arretrate, accompagnati da alaterno (*Rhamnus alaternus*), lentisco (*Pistacia lentiscus*) e mirto (*Myrtus communis*) che sono la tipica vegetazione delle aree costiere del bacino mediterraneo.



Figura 30: Tipica vegetazione del Parco Naturale

Dove l'acqua ristagna più a lungo sono presenti principalmente frassini (*Fraxinus oxycarpa*), ontani (*Alnus glutinosa*) e alcune piante rare come la periploca (*Periploca greca*), mentre in ambienti meno umidi a queste specie si associano quercia (*Quercus robur*), pioppo bianco (*Populus alba*), olmo campestre (*Ulmus minor*), carpino bianco (*Carpinus betulus*), melo selvatico (*Malus sylvestris*) e fico (*Ficus carica*).

Le depressioni interdunali interne alla foresta, le cosiddette “Lame”, sono caratterizzate dalla presenza di acqua quasi tutto l'anno, indipendentemente dalle precipitazioni atmosferiche, poiché l'acqua affiora dalla falda superficiale.



Figura 31: Vista delle “lame” del Parco

Per quanto riguarda le temperature, queste corrispondono ad una media annua di 15 °C, con la media massima di 33 °C e la minima di -2 °C. Tra i venti più rappresentati, l'area del Parco è interessata da quelli del secondo quadrante (S-E) e dell'ovest. Il vento dominante, per quanto riguarda le frequenze, viene da E-S-E, quindi tra Scirocco e Levante; per velocità domina invece il vento proveniente da W-S-W, fra Libeccio e Ponente.

I venti influiscono molto sui valori di umidità che varia anche con il variare della morfologia del territorio e, durante la notte, raggiunge molto spesso la saturazione; i valori medi più bassi (60%) si raggiungono nelle ore centrali delle giornate di Luglio.

Nel SIC “Selva Pisana”, si individuano 8 habitat riconducibili ad ambienti di costa sabbiosa (4), di aree umide salmastre o dulcacquicole (2) e di ambienti forestali (2).

Tre habitat risultano prioritari con particolare riferimento a ‘*Dune costiere con vegetazione a ginepri*’, ‘*Dune con vegetazione alto arborea a dominanza di Pinus pinea e/o Pinus pinaster*’ e ‘*Paludi calcaree con Cladium mariscus e specie del Caricion davallianae*’.

Il sito ospita una fauna selvatica assai ricca, in relazione alla grande eterogeneità ambientale del suo territorio, caratterizzato da una forte presenza di daini (*Dama dama*) e cinghiali (*Sus scrofa*), oltre ad altri mammiferi quali volpi (*Vulpes vulpes*), istrici (*Hystrix cristata*), ghiri (*Myoxus glis*), tassi (*Meles meles*), faine (*Martes foina*), donnole (*Mustela nivalis*), tassi (*Meles meles*), puzzole (*Mustela putorius*), scoiattoli (*Sciurus vulgaris*), topi quercini (*Eliomys quercinus*), e moscardini (*Muscardinus avellanarius*).



Figura 32: Daini in fase di cattura

Nelle formazioni forestali, oltre a numerosi passeriformi, sono da segnalare il picchio rosso maggiore (*Picoides major*), il più raro picchio rosso minore (*P. minor*) e un'interessante popolazione nidificante di colombella (*Columba oenas*). Nelle aree palustri sono molto numerosi gli anfibi, tra i quali spicca il rospo smeraldino (*Bufo viridis*), e i Rettili, tra i quali la biscia dal collare (*Natrix natrix*). Nei canali è possibile incontrare la testuggine d'acqua (*Emys orbicularis*). Le zone umide di S. Rossore (Iame) sono di una certa importanza per la sosta e lo svernamento di un gran numero di anatidi (fischione *Anas penelope*, canapiglia *A. strepera*, germano reale *A. platyrhynchos*, alzavola *A. crecca*), oltre a limicoli di prateria (chiarlo *Numenius arquata*, pavoncella *Vanellus vanellus*, piviore dorato *Pluvialis apricaria*), ma

soprattutto costituiscono un'importantissima zona di sosta per limicoli migratori trans-sahariani (in particolare il chiurlo piccolo *Numenius phaeopus*, il piovanello *Calidris ferruginea* e il piovanello tridattilo *Calidris alba*), starne e ardeidi. Fra le specie di uccelli che nidificano nell'ambiente dunale spiccano invece l'occhione (*Burhinus oedicephalus*), ormai rarissimo per l'erosione costiera e la calandrella (*Calandrella brachydactyla*).

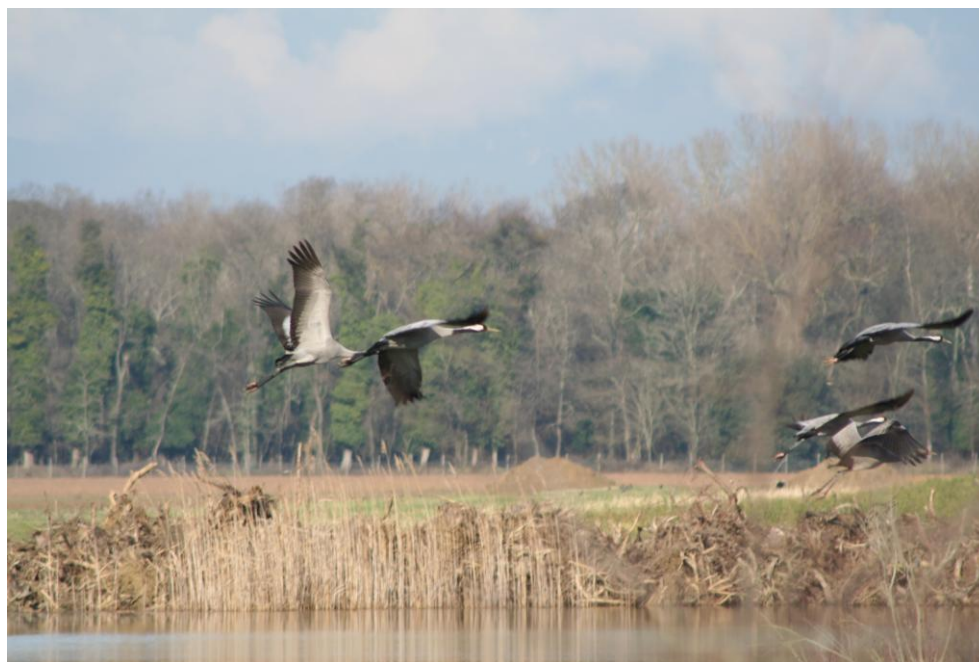


Figura 33: Gru in volo all'interno del Parco

Nell'area del parco sono presenti allevamenti di cavalli, distribuiti in 12 centri ippici, 18 scuderie, 3 centri di allevamento e un centro di incremento ippico; 12 allevamenti bovini, di cui 4 per la produzione di latte e 8 per la produzione di carne, 12 allevamenti ovini e vari allevamenti avicoli e cunicoli (www.parcosanrosso.it).



Figura 34: Cavalli al pascolo in allevamento brado

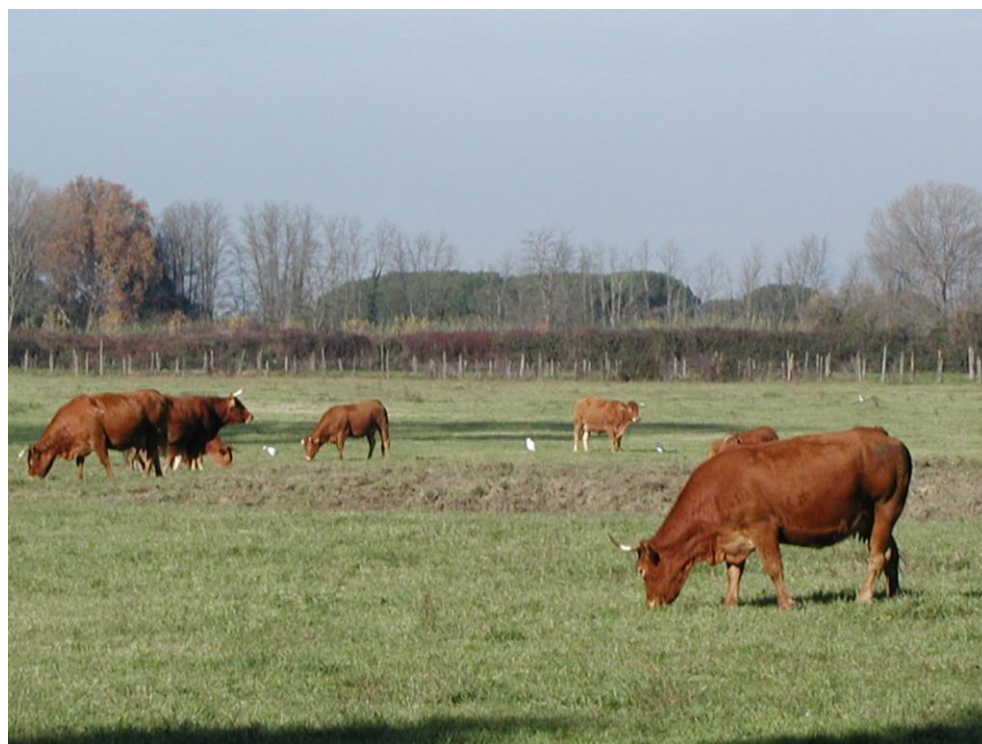


Figura 35: Bovini da carne al pascolo in azienda biologica

LE ZANZARE

Le zanzare (Culicidae) sono una famiglia di insetti appartenenti all'ordine dei Ditteri.

- Phylum Artropoda
- Classe Insecta
- Ordine Diptera
- Sottordine Nematoceri
- Famiglia Culicidae

I culicidi sono insetti molto adattabili ai vari tipi di ambiente e questa loro caratteristica ha permesso la loro distribuzione in tutto il mondo: alcune specie vivono in aree pianeggianti, altre in aree collinari e montane, alcune in habitat marini. Nel nostro paese sono presenti 64 specie di Culicidi (60 delle quali autoctone) appartenenti a 2 sottofamiglie (Anophelinae e Culicinae) e 8 generi (Romi et al., 1997).

❑ Sottofamiglia: **Anophelinae**

Genere: *Anopheles* (16 specie)

❑ Sottofamiglia: **Culicinae**

Genere: *Aedes* (6 specie)

Genere: *Ochlerotatus* (20 specie)

Genere: *Culex* (12 specie)

Genere: *Coquillettidia* (2 specie)

Genere: *Orthopodomyia* (1 specie)

Genere: *Uranotaenia* (1 specie)

Genere: *Culiseta* (6 specie)

Le specie di maggiore interesse sanitario vista la loro capacità di trasmettere agenti infettivi appartengono ai generi *Anopheles*, *Aedes*, *Culex*, *Ochlerotatus* (Romi et al., 1997).

MORFOLOGIA DELLE ZANZARE

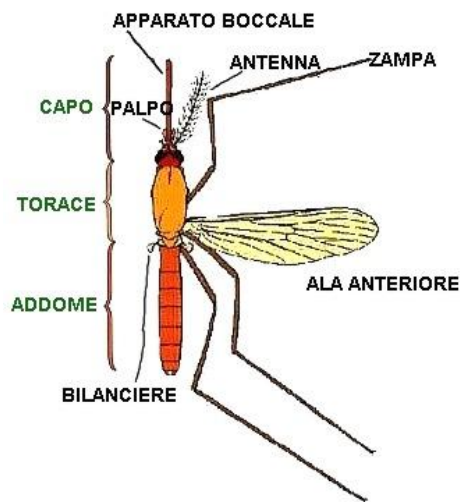


Figura 36: Visualizzazione schematica di una zanzara

Il corpo dei culicidi può misurare dai 4 ai 10 mm ed è suddiviso in tre parti: testa, torace e addome.

Le zanzare posseggono un esoscheletro cuticolare che le protegge dalla disidratazione e conferisce rigidità al corpo. L'esoscheletro è composto da un'alternanza di placche chitinee dette scleriti e da porzioni flessibili che permettono movimenti tra le differenti parti del corpo.

La testa è piccola e sferica, gli occhi sono prominenti, le lunghe antenne sono costituite da 15 segmenti e fungono da organi di senso. Le antenne sono piumose nel maschio e con pochi peli nella femmina. L'apparato boccale è costituito da una proboscide e da un paio di palpi con funzione sensoriale situati lateralmente, divisi in 3-5 segmenti. Negli Anophelinae i palpi sono lunghi quasi come la proboscide, sono più corti nei Culicinae. La proboscide è composta dal labium (labbro superiore), epifaringe, ipofaringe, un paio di mascelle e un paio di mandibole modificate a formare lo stiletto. Quando la femmina punge un ospite, il labium si ritira indietro e lo stiletto penetra nella pelle.

Alla testa fa seguito un collo che la separa dal torace. Il torace è costituito da 3 porzioni dette protorace, mesotorace e metatorace e ad ognuno di questi segmenti è articolato un paio di zampe lunghe e sottili. Il mesotorace è articolato con un paio di ali, il metatorace con un secondo paio di ali trasformate in bilancieri indispensabili per il volo.

L'addome è composto da dieci segmenti dei quali gli ultimi hanno funzione di apparato genitale esterno nel maschio.

Gli individui appartenenti ai due sessi presentano notevoli differenze. La femmina è ematofaga, ha un apparato boccale di tipo "pungente-succhiante" con cui può compiere sia il "pasto di sangue" (almeno uno di questi è necessario per la maturazione delle uova), che assumere fluidi vegetali oltre che fluidi organici in decomposizione. Il maschio ha un apparato boccale di tipo lambente per cui non è in grado di pungere ma può solamente assumere liquidi organici di cui si nutre anche la femmina.

CICLO BIOLOGICO DEI CULICIDI

I culicidi sono insetti olometaboli, ovvero hanno un ciclo biologico che comprende più stadi: uovo, larva, pupa, adulto.

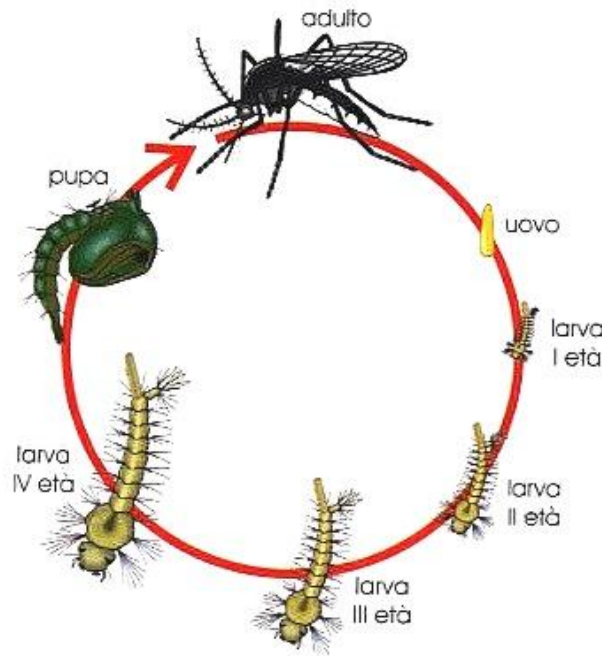


Figura 37: Ciclo biologico dei Culicidi

La deposizione delle uova avviene di solito direttamente sulla superficie dell'acqua (*Culex*), su foglie di piante acquatiche (*Coquillettidia* o *Mansonia*) o su supporto solido ma umido (*Aedes*). Esistono pertanto specie che depongono in pozze di acqua piovana, altre che depongono in acqua stagnante, altre ancora in acqua salmastra e anche in acqua di mare. A seconda delle specie, le uova possono essere unite in piccoli "grappoli" galleggianti (ad esempio nel genere *Culex*) oppure deposte singolarmente e dotate di un organo galleggiante (genere *Anopheles*). Le uova di *Aedes*, non deposte sulla superficie dell'acqua ma su superfici umide, devono comunque essere sommerse (anche se possono resistere all'asciutto in caso di siccità) per poter completare l'embriogenesi e schiudersi. In base alla specie, il numero di uova deposte per femmina dopo il pasto di sangue può variare dalle 100 alle 400.



Figura 38: Uova di zanzara *Aedes albopictus*

Le uova non possono maturare a meno che la femmina si nutra di sangue, fonte di amminoacidi e altre sostanze indispensabili alla loro maturazione. La quantità di sangue ingerita influenza il numero di uova che verranno deposte, ma questo numero può variare anche in base alla specie. Le uova si schiudono dopo circa 2-3 giorni di incubazione e da queste emergono larve vermiformi; vi sono 4 stadi larvali e uno di pupa prima di diventare adulti. Il ciclo si completa in un periodo di 6-16 giorni, valore variabile in base alla specie e alla temperatura. Nei paesi a clima temperato come l'Italia la presenza degli adulti è limitata ad alcune stagioni (primavera, estate ed autunno).

Le femmine di zanzara sono attratte dall'emissione di CO₂ e dall'odore dell'animale ospite e lo localizzano in base a gradienti di temperatura e umidità. Alcune specie di zanzare non si allontanano molto dall'habitat larvale (anche pochi metri), mentre altre possono spostarsi per più di 50 km. La ricerca dell'ospite segue ritmi diversi in base alla specie: alcune pungono durante la notte, prevalentemente le zanzare del genere *Culex* e *Anopheles*, altre prevalentemente di giorno, in particolare le zanzare del genere *Aedes*.

La durata degli stadi di uovo, larva e pupa varia a seconda della specie e dalla temperatura esterna.

Gli stadi larvali delle zanzare vivono in acqua, ma respirano l'ossigeno dall'atmosfera. Le larve possiedono una testa con un paio di antenne, occhi, una bocca e hanno un corpo rivestito di ciglia. L'apparato boccale è di tipo masticatore e grazie a questo si nutrono di alghe e detriti vari. La funzione respiratoria è espletata dagli stigmi situati all'estremità posteriore dell'addome in alcune specie, da un organo tubulare detto sifone in altre. Le larve sono prive di zampe, ma possono spostarsi velocemente nell'acqua con movimenti addominali.



Figura 39: Larva di zanzara

Le pupe sono acquatiche, e non si nutrono. La testa e il torace risultano fusi insieme a formare il cefalotorace, l'addome è ripiegato su se stesso ed è flessibile. Nel giro di qualche giorno il tegumento esterno che riveste le pupe si rompe e fuoriesce l'esemplare adulto (sfarfallamento).



Figura 40: Pupa o ninfa di zanzara

SPECIE DI ZANZARE CAPACI DI TRASMETTERE VIRUS DEL GRUPPO ENCEFALITE GIAPPONESE

- Culex annulirostris*
- Culex bitaeniorhynchus*
- Culex gelidus*
- Culex pipiens*
- Culex quinquefasciatus*
- Culex sitiens*
- Culex tritaeniorhynchus*
- Culex vishnui*

- Aedes albopictus*
- Aedes japonicus*
- Aedes koreicus*
- Aedes togoi*
- Aedes vexans*

- Anopheles annularis*
- Anopheles sinensis*
- Anopheles vagus*

- Armigeres subalbatus*

Genere *Culex*



Culex pipiens, detta anche “zanzara comune”, è diffusa in tutti i paesi dell’emisfero boreale ed è la specie di zanzara più diffusa nel nostro paese. Solitamente è presente solo in estate e in autunno. Essa si riproduce preferenzialmente in acque calde e stagnanti anche in volumi molto piccoli. Le femmine possono pungere l’uomo sia all’interno delle abitazioni che all’esterno e non si allontanano più di qualche chilometro dal luogo dello sfarfallamento.

Esistono due forme biologiche di *C. pipiens*: la più primitiva rurale e ornitofila e quella più evoluta antropofila particolarmente adattata agli ambienti antropizzati (Severini et al., 2009). Dal punto di vista biologico la forma antropofila si differenzia da quella rurale per caratteri che si sono selezionati in seguito all'adattamento alla vita in ambienti chiusi, spesso ipogei. Essa è infatti in grado di accoppiarsi in spazi ristretti, di compiere il primo ciclo gonotrofico senza pasto di sangue e di non effettuare la diapausa invernale (Severini et al., 2009).

E’ stata ritrovata infetta da *virus Sindbis*, da *virus West Nile* ed è il vettore più importante di *Bancroftian filariasis* (www.wrbu.org); in gruppi di *Culex pipiens* sono stati ritrovati anche *virus Usutu* (Busquez et al., 2008; Calzolari et al., 2010; Tamba et al., 2011) e *virus Encefalite Giapponese* (Sucharit et al., 1989).



Culex sitiens è diffusa prevalentemente nei paesi che circondano l'Oceano Indiano (paesi orientali dell'Africa, Arabia Saudita, India, Australia, sud-est asiatico, Giappone) si riproduce prevalentemente nelle acque salmastre, sotterranee e in alcuni contenitori artificiali nelle zone costiere. Gli ospiti preferenziali sono uccelli e suini, occasionalmente anche l'uomo. In *C. sitiens* sono state ritrovate larve della filaria *Brugia malayi* in Thailandia. Questa zanzara è vettore del *virus Encefalite*

Giapponese (www.wrbu.org; Vythilingam et al., 1994).



Culex gelidus è una specie diffusa unicamente nel sud-est asiatico, segnalata in paesi come Cina, India, Giappone, Malesia, Nepal, Filippine, Thailandia e Vietnam. Le larve si possono trovare in una grande varietà di habitat che va da aree dove l'acqua è permanente (laghi) a stagni o piccole pozze d'acqua presenti solo per un certo periodo dell'anno. Sono state ritrovate anche in contenitori artificiali come barili e serbatoi d'acqua. Le femmine preferiscono pungere animali domestici come i suini piuttosto che l'uomo. *Culex gelidus* è vettore del *virus Encefalite Giapponese* in Malesia e Thailandia

(www.wrbu.org; Sucharit et al., 1989; Lindahl et al., 2012).



Culex tritaeniorhynchus è una specie di zanzara molto diffusa, sia in Asia in paesi come la Cina, l'India e il Giappone che in vari stati Africani. E' molto adattabile e depone in vari habitat, dalle acque permanenti a stagni o pozze presenti solo in certi periodi, sia sotto la luce del sole diretta che in ambienti ricchi di vegetazione. A volte depone anche in habitat artificiali o secchi, purché caratterizzati da bassa salinità. Le femmine pungono preferenzialmente i suini ma in loro assenza possono pungere l'uomo. Questa specie è principale vettore del *virus Encefalite Giapponese* nei paesi orientali (Theodore

et al., 1990), mentre non sembra trasmettere altre malattie (www.wrbu.org).



Culex Bitaeniorhynchus è una specie molto diffusa segnalata in molti paesi asiatici tra cui India, Giappone e Russia, in Australia e nei paesi dell'Africa centro-meridionale. Il suo habitat è limitato e le larve sopravvivono solamente in acque contenenti alghe del genere *Spyrogira*. Le femmine pungono principalmente gli uccelli, ma spesso anche l'uomo. In questa specie sono state trovate larve dei filaridi *Wuchereria Bancrofti*, causa della filiasi linfatica nell'uomo in India, e *Burgia malayi* in Sri Lanka. In Australia è stata associata a *virus Encefalite Murray Valley* e in India al *virus Batai* (www.wrbu.org). In Corea è stata trovata infetta da *virus Encefalite Giapponese* (Kim et al., 2011).



Culex quinquefasciatus è una specie molto diffusa, preferisce pungere l'uomo rispetto ad altri mammiferi. E' presente in USA, in Sudamerica, in alcuni paesi Africani e nella maggior parte dell'Asia tra cui Giappone, India e Cina. Le larve sono presenti solitamente nei pressi delle abitazioni umane e in raccolte d'acqua che presentano molte sostanze organiche. Sono attive principalmente la notte, e importanti a livello sanitario in quanto sono vettori di *Wuchereria bancrofti*, virus *Encefalomyelitis Equina Occidentale* e virus *Encefalite di St. Louis*; sono coinvolte anche nella trasmissione della filariosi canina (www.wrbu.org) e sono vettori del virus *Encefalite Giapponese* (Lindhahl et al., 2012).



Culex vishnui è una specie presente in tutto il sud-est Asiatico, compresi Cina, Giappone e India. Depone le uova solitamente in ambienti con basse quantità d'acqua come stagni, fossi, pozzanghere e tracce di pneumatici, ma può proliferare anche in luoghi dove è abbondante la vegetazione acquatica, come le risaie. Le femmine si nutrono principalmente su uccelli e suini, ma possono pungere l'uomo in loro assenza. Si tratta di un importante vettore del virus dell'*Encefalite Giapponese* ma non sembra trasmettere altre malattie (www.wrbu.org; Kuwata et al., 2013).



Culex annulirostris è presente solamente in Australia e nelle isole circostanti, si riproduce in acque pulite con vegetazione emergente e abbondanza di alghe, e in alcuni ambienti artificiali come pozzi poco profondi e vasche di cemento. In Nuova Guinea è conosciuta per la trasmissione di *W. Bancrofti* (www.wrbu.org) ed è un vettore del *virus Encefalite Giapponese* (Van den Hurk, 2008).

Genere *Aedes*



Aedes albopictus (Skuse), detta "zanzara tigre", origina dalle foreste tropicali del sud-est asiatico. La specie è diffusa in tutta l'Asia sud-orientale, dall'India al Giappone, nella maggior parte delle isole dell'Oceano Indiano e in Madagascar. Negli ultimi 50 anni l'area di diffusione si è notevolmente ampliata. Dal 1986 la specie è presente negli Stati Uniti, dove ha rapidamente colonizzato tutti gli stati ad est delle Montagne Rocciose. La prima segnalazione in Europa è venuta dall'Albania, dove la specie è probabilmente arrivata dalla Cina, seguita dall'Italia e dalla Francia. In Italia è stata segnalata per la prima volta nel settembre del 1990. Al primo reperto di pochi adulti nella città di Genova è seguita, nell'estate successiva, la scoperta di numerosi focolai larvali della

specie in provincia di Padova. In Italia le uova della "zanzara tigre" sono arrivate attraverso il commercio di copertoni usati importati dagli USA (Dalla Pozza et al., 1994) ma ragionevolmente le infestazioni sono il risultato di molteplici introduzioni, forse anche con merci diverse da aree diverse. Anche la rapida diffusione interna in Italia è stata legata, perlomeno in un primo momento, al commercio interno di copertoni usati che le grandi aziende importatrici, prevalentemente localizzate in Veneto ed Emilia-Romagna, rivendono ad imprese minori che li rigenerano.

Negli anni immediatamente seguenti fu chiaro che la zanzara era in grado di superare le rigide stagioni invernali dell'Italia settentrionale e che numerose popolazioni dell'insetto erano già fortemente radicate sul territorio di varie regioni.

Nei luoghi di origine della specie i focolai larvali tipici sono rappresentati da cavità nel tronco degli alberi, dagli incavi delle ascelle fogliari di grosse piante, dalle cavità dei bambù spezzati e da piccole pozze tra le rocce. La grande capacità di adattamento ad ambienti diversi ha consentito a questa zanzara di estendersi nel tempo prima agli insediamenti umani

confinanti con la foresta, poi ad ambienti suburbani e urbani. In particolare, l'elemento determinante per la sua diffusione è la capacità di poter utilizzare per la deposizione delle uova una grande varietà di micro e macro contenitori derivanti dall'attività umana. In ambiente peridomestico prevalgono come focolai larvali i contenitori adibiti alla conservazione dell'acqua per usi diversi, bidoni, bacinelle, sottovasi, vasche senza ricambio d'acqua. Altri focolai larvali ideali sono anche le caditoie dei chiusini per la raccolta e lo smaltimento delle acque di superficie. La zanzara tigre è attiva durante le ore diurne e punge preferenzialmente l'uomo, con una aggressività fuori dal comune (Romi et al., 2001).

Aedes albopictus è conosciuta come vettore di varie malattie infettive; può essere vettore del *virus Chikungunya* e del *virus Dengue*, due patogeni la cui trasmissione è stata provata in campo (Medlock et al., 2012). Di altri virus come il *virus Encefalite Equina Orientale*, *virus Encefalite Equina Venezuelana*, *virus La Crosse*, *virus West Nile* e *virus Encefalite Giapponese*, trovati nei pool di zanzare esaminati, non è stata verificata l'efficacia di *Aedes albopictus* come vettore in campo. In questa specie di zanzara è stato anche trovato RNA del *virus Usutu* (Calzolari et al., 2010; Tamba et al., 2011).



Aedes togoi è una specie presente in Nord America e in Asia, compresi Cina, Giappone, Corea e Russia. Le larve sono comuni nelle aree costiere nelle pozze di acqua marina stagnante o in contenitori artificiali di acqua salata, oltre che in acqua salmastra. Solo occasionalmente depongono in contenitori di acqua dolce. Le femmine pungono principalmente l'uomo in ogni momento della giornata, e solo in sua assenza si nutrono su animali. E' un vettore di *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti*, *Dirofilaria immitis* e del *virus Encefalite Giapponese* (www.wrbu.org; Sucharit et al.,

1989).



Aedes japonicus è una specie presente sia in USA che in Asia in Cina, Giappone e Corea. La deposizione delle uova avviene in molti luoghi, sia naturali che artificiali, anche se solitamente preferisce luoghi ombreggiati con acqua ricca di materiale organico. I fori nelle rocce contenenti acqua sembrano però essere in assoluto l'habitat preferito della specie, e possono sopravvivere all'inverno come larve nelle regioni temperate, come uova negli ambienti più freddi. Gli adulti sono attivi soprattutto durante il giorno e preferiscono pungere uccelli e piccoli roditori rispetto all'uomo. E' un vettore di alcuni virus

come il *virus West Nile* (www.wrbu.org) oppure il *virus Encefalite Giapponese* (Sucharit et al., 1989).



Aedes koreicus è una specie asiatica originaria della Corea, Giappone, Cina e Russia orientale. Si nutre su esseri umani e animali domestici, e sembra essere ben adattata per l'ambiente urbano. Le larve si sviluppano in tutti i tipi di contenitori artificiali o nelle cavità delle rocce o degli alberi. Gli adulti sembrano pungere gli

esseri umani sia durante il giorno che di notte. Come altre specie del genere *Aedes*, *Aedes koreicus* entra in diapausa (arresto spontaneo dello sviluppo per sopravvivere a condizioni ambientali avverse) nella fase di uovo. Rispetto alla zanzara tigre asiatica, *Aedes koreicus* sembra essere più tollerante ad un clima freddo, rendendo questa specie in grado di sopravvivere e di affermarsi nelle zone collinari e pre-alpine d'Italia. Questa specie è stata segnalata in Belgio nel 2008, dove si è stabilita con successo. Queste sono le prime segnalazioni di questa zanzara al di fuori del suo areale di distribuzione originario, dimostrando la sua capacità di stabilire e colonizzare nuove aree in un clima temperato. In

Italia è stata segnalata per la prima volta in Veneto nel 2011 (Capelli et al., 2011). E' un vettore per ora dimostrato solo in laboratorio del *virus Encefalite Giapponese*.



Aedes vexans è una specie molto diffusa nel mondo, si trova in Asia, Australia, Nord America e vari paesi Europei. Si tratta di una specie molto adattabile le larve possono sopravvivere in molti ambienti, tra cui laghi di acqua dolce, fossati, paludi o piccole pozzanghere; solitamente gli ambienti in cui depone sono poveri di alghe e vegetazione acquatica. Questa specie è attiva principalmente la sera e la notte, a differenza della maggior parte delle zanzare del genere *Aedes*. Gli ospiti preferenziali sono l'uomo e il bovino. Sono vettori di vari agenti infettivi come il *virus Encefalite Equina Orientale*, il *virus Encefalite Equina Occidentale*, alcuni *flavivirus* come *virus Encefalite Saint Louis*, *virus West Nile*, *virus Encefalite Giapponese* (Sucharit et al., 1989) e *Dirofilaria immitis*.

Genere *Anopheles*



Anopheles sinensis è una specie presente solamente nel sud-est Asiatico, soprattutto in Cina, ma anche in Giappone, India e paesi circostanti; depone in riserve d'acqua pulita poco profonda, solitamente ricca di vegetazione e illuminata dalla luce del sole diretta come ambienti agricoli (soprattutto risaie). Le femmine pungono varie specie animali, difficilmente si nutrono sull'uomo, anche perché sono esofiliche (raramente entrano in ambienti chiusi). Possono trasmettere la malaria (www.wrbu.org) e sono vettori del virus

Encefalite Giapponese (Liu et al., 2013).



Anopheles annularis è presente solamente nel sud-est Asiatico, Cina, India e paesi circostanti e si trova principalmente in ambienti con acqua pulita ed abbondante vegetazione come risaie o piccoli stagni. Gli adulti si nutrono principalmente su animali, raramente sull'uomo. *Anopheles annularis* è uno dei vettori della malaria (www.wrbu.org) e può trasmettere il virus *Encefalite Giapponese* (Sucharit et al., 1989).



Anopheles vagus è presente nel sud-est asiatico, Cina e India. Le uova vengono deposte sia in pozze di acqua fangosa che in fossati, preferenzialmente contenenti acqua salata. Le femmine preferiscono pungere gli animali e sono riluttanti a pungere l'uomo. Fino a poco tempo fa non erano considerate vettori di malattie umane (www.wrbu.org), ma più recentemente sono state dimostrate essere vettori del *virus Encefalite Giapponese* (Sucharit et al., 1989).



Genere *Armigeres*

Armigeres subalbatus è una specie tipica del sud-est asiatico e del Giappone, tende a deporre le uova in contenitori artificiali contenenti acqua sporca o inquinata. Gli adulti pungono tutto il giorno sia gli animali che l'uomo. I picchi di attività si registrano all'alba e al tramonto. Questa specie è vettore di *W. bancrofti* (WBRU, 2010) e può trasmettere il *virus Encefalite Giapponese* (Liu et al., 2013).

PARTE SPERIMENTALE.

MATERIALI E METODI

Raccolta delle zanzare

Sono state posizionate tre trappole (BG-SENTINEL, I.N.D.I.A., Padova) per la cattura delle zanzare in siti ad elevato rischio epidemiologico a causa della presenza di animali potenzialmente recettivi.

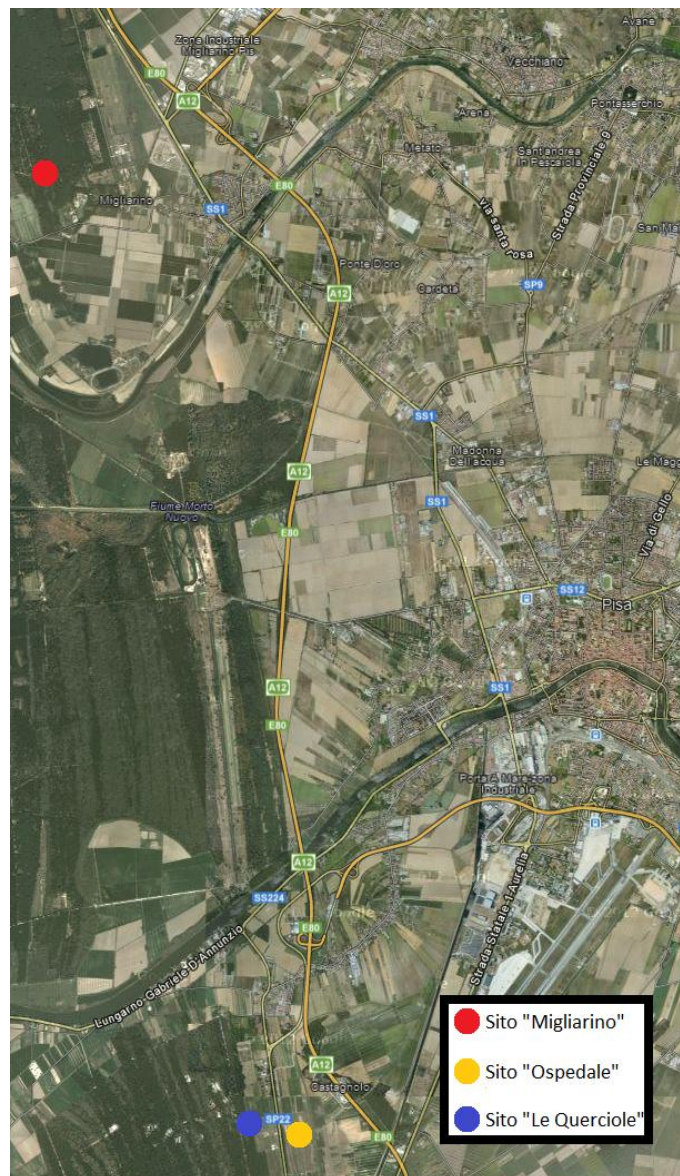


Figura 41: Posizioni delle trappole rispetto alla città di Pisa

La prima trappola è stata posizionata per due anni consecutivi, nel periodo da Luglio a Novembre 2009 e nel periodo da Settembre a Novembre 2010, nel comprensorio di Migliarino (Pisa) presso un'abitazione dove in un recinto poco distante erano presenti un cavallo e un asino, quest'ultimo dubbio a test di screening per virus del JE Group.



Figura 42: Posizione della trappola del sito "Migliarino" rispetto agli animali



Figura 43: Posizione della trappola del sito "Migliarino" rispetto all'ambiente circostante

La seconda trappola è stata posizionata da Maggio a Novembre 2011 all’Ospedale Didattico “Mario Modenato” di S. Piero a Grado (Pisa) in prossimità di un allevamento di asini e cavalli, entrambe specie recettive a vari virus del gruppo encefalite giapponese.

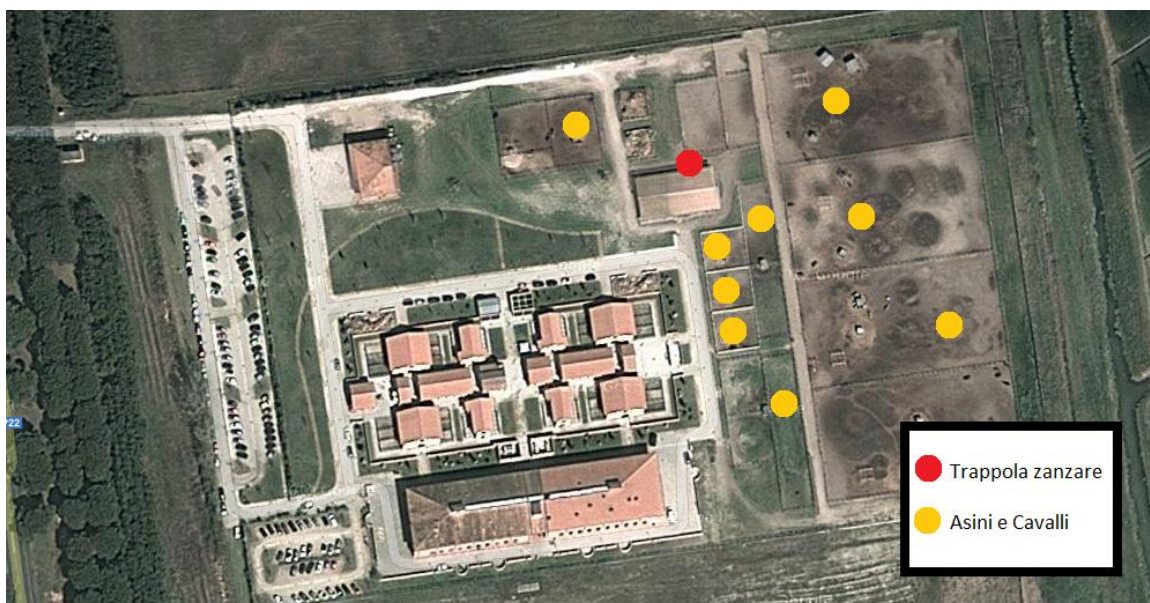


Figura 44: Posizione della trappola del sito “Ospedale Didattico” rispetto agli animali

La terza trappola è stata posizionata da Maggio a Novembre 2011 presso il Podere “Le Querciole” San Piero a Grado (Pisa) presso un allevamento avicolo sperimentale di polli, faraone e fagiani, specie avicole recettive per diversi virus del gruppo encefalite giapponese.

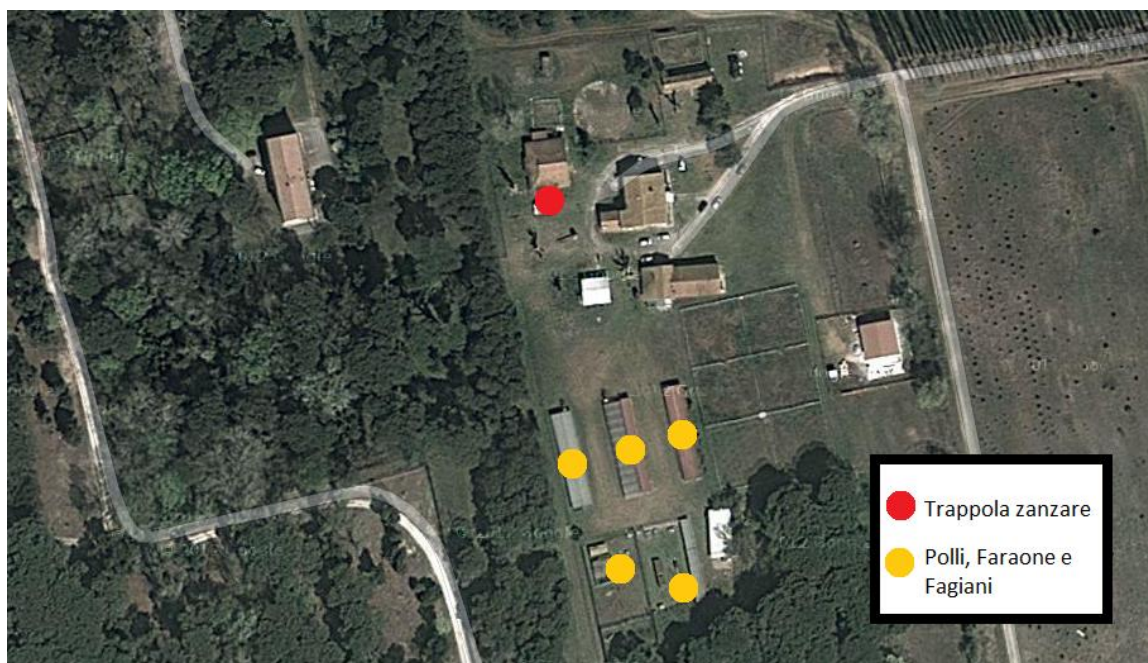


Figura 45: Posizione della trappola del sito “Le Querciole” rispetto agli animali



Figura 46: Posizione delle due trappole dei siti “Ospedale Didattico” e “Le Querciole” rispetto all’ambiente circostante

Trappole utilizzate per le catture delle zanzare



Figura 47. Trappola BG-Sentinel per la cattura degli insetti

BG-Sentinel (I.N.D.I.A., Padova) è la trappola utilizzata in questa indagine per la cattura degli insetti. Si tratta di una trappola realizzata dall'azienda tedesca BioGents, facente parte dell'Istituto di Zoologia dell'Università di Ratisbona (Germania). Tale trappola venne originariamente progettata per la cattura della zanzara responsabile della febbre gialla (*Aedes aegypti*); poi, nel corso delle sperimentazioni, ha dimostrato di essere efficace anche nei confronti di altre zanzare quali *Aedes albopictus* (zanzara tigre), *Aedes polynesiensis*, *Culex pipiens*, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles* spp.

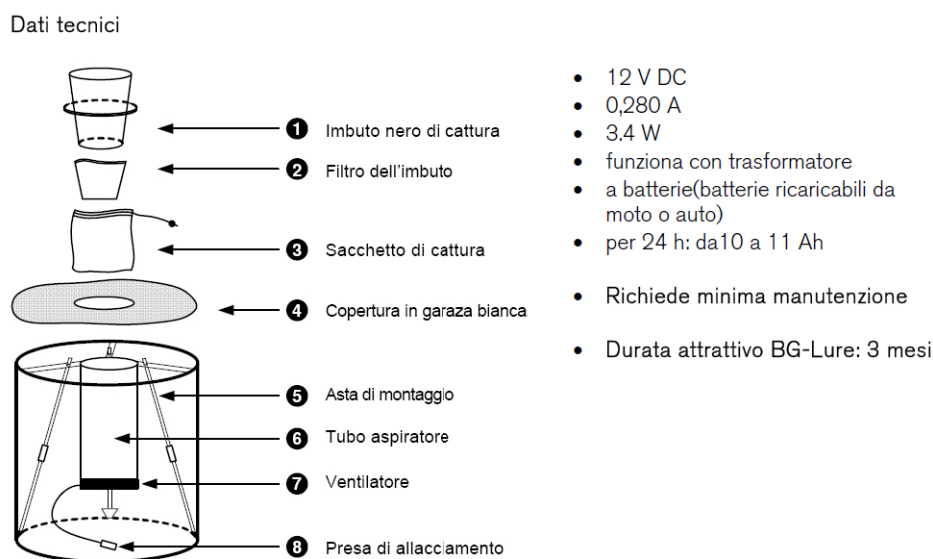


Figura 48: Schema di funzionamento della trappola BG-Sentinel

BG-Sentinel utilizza un attrattivo artificiale (BG-lure) non inquinante per l'ambiente che simula il sudore umano: si tratta di una miscela di acido lattico, ammoniaca e altre sostanze organiche. L'attrattivo, contenuto in una busta sigillata, è inserito all'interno della trappola, nell'apposito alloggiamento. Le indicazioni del produttore ne consigliano la sostituzione dopo tre mesi. Gli odori attrattivi vengono emanati e diffusi nell'ambiente da una ventola elettrica posizionata sotto la busta, quindi la trappola attira le zanzare che vengono catturate nell'apposito sacchetto studiato per favorirne l'ingresso e impedirne la fuga. La particolare forma ed il colore bianco hanno potere attrattivo e aumentano notevolmente la capacità di cattura.



Figura 49: Schema di funzionamento della trappola: in rosso la direzione dell'attrattivo, in giallo la direzione degli insetti in entrata.

Campionamento delle zanzare

In totale sono state effettuate 90 catture: 10 nel 2009 nel primo sito a Migliarino, 8 nel 2010 sempre a Migliarino e 72 nel 2011: 37 nel sito "Ospedale Didattico" e 35 nei pressi del podere "Le Querciole".

La raccolta delle zanzare è stata programmata a intervalli regolari: ogni 7 giorni per quanto riguarda la prima trappola e ogni 5 giorni per la seconda e la terza.

I campioni raccolti sono stati recapitati e registrati presso il Dipartimento di Patologia Animale. Ogni campione è stato congelato a -20°C per 20 minuti allo scopo di uccidere gli insetti e successivamente esaminato al microscopio; le zanzare sono state separate da altri insetti sporadicamente presenti nelle catture e suddivise per sesso e specie in base alle caratteristiche morfologiche (Severini et al., 2009); le femmine, suddivise per data e luogo di cattura, sono state conservate a -20°C fino al momento della spedizione al CESME presso l'IZS di Teramo dove sono state sottoposte a ricerca dei virus JEV, WNV e USUV mediante RT-PCR specifica.



Figura 50: Esempio di campioni conservati in provetta dopo la suddivisione per data, luogo di raccolta, sesso e specie delle zanzare

Protocolli di laboratorio

Nel laboratorio del CESME sono stati analizzati gruppi di zanzare di ogni cattura di ciascuno dei tre siti. Nella relazione sulle analisi effettuate (Protocollo 2305 dell'8 Marzo 2010) si riportano i metodi utilizzati: per ogni campione di zanzare è stato effettuato un pool ($n < 50$). Ogni pool è stato esaminato per la presenza di RNA virale di *Flaviviridae*, *virus West Nile* (WNV) e del *virus Encefalite Giapponese* (JEV) mediante real-time RT-PCR e *virus Usutu* (USUV) mediante RT-PCR convenzionale. In caso di positività l'amplificato o l'RNA estratto è stato sequenziato e la sequenza comparata con quelle della stessa regione genomica depositata in Genbank.

Nella pubblicazione del 2011 Savini et al. riferiscono che i nostri campioni sono stati sottoposti a tentativi di isolamento su fibroblasti di embrione di pollo, cellule epatiche di embrione di pollo e di cellule VERO E6. Le colture cellulari sono state incubate a 37,8 °C per 7 giorni e sono stati verificate ogni giorno per valutare la presenza di effetto citopatico (CPE). In assenza di CPE questa procedura veniva ripetuta per tre volte. Alla fine del terzo tentativo, in caso del CPE, la presenza del virus nei surnatanti veniva confermata o esclusa mediante microscopia elettronica o immunofluorescenza diretta (IFA) usando un anticorpo

monoclonale (prodotto da ICT, Italia) specifico.

Per confermare l'identificazione del virus, sui campioni positivi è stata effettuata una seconda RT-PCR specifica.

Le sequenze amplificate prodotte sia dal segmento pre-M che dall'NS5 sono state sequenziate (602 bp pre-M e 583 bp NS5) e allineate con le sequenze corrispondenti depositate in Genbank (GbjAY453411.1; gbjEF206350.1).

Le differenze tra le sequenze di NS5 sono state analizzate utilizzando il programma PHYLIP (Felsenstein, 1993). Per l'analisi filogenetica è stato scelto un appropriato modello di sostituzione nucleotidica, il modello a due parametri (Kimura, 1980).

L'RNA virale è stato estratto dai campioni con l'High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche, Germania), diluito in 50 ul di soluzione tampone secondo le istruzioni del produttore e utilizzato per la reazione di RT-PCR eseguita con l'RT-PCR Onestep kit (Qiagen). Precisamente, per ogni campione la miscela conteneva 21,8 ul di RNasi libera in acqua, 10 ul di soluzione Q, 2 ul di miscela enzimatica, 1,6 ul di ciascun Primer (50 pmol/ul), 10 ul di soluzione tampone One-Step 5x, 2 ul di dNTPs (10 mM) e 5 ul di RNA denaturato per un volume complessivo di 50 ul.

La trascrizione inversa è stata eseguita a 45 °C per 30 minuti seguita dalla fase di attivazione a 95 °C per 5 minuti. Sono stati eseguiti per l'amplificazione quaranta cicli a 95 °C per il 30 secondi, a 55 °C per 30 secondi e a 72 °C per 2 minuti, dopodiché per l'amplificazione finale la temperatura è stata lasciata a 72 °C per 5 minuti.

RISULTATI

Nel primo sito, “Migliarino”, nel corso dell’anno 2009 sono stati identificati due generi di culicidi: *Aedes albopictus* con una prevalenza complessiva del 70,25% e *Culex pipiens* con una prevalenza del 29,75%. Nei primi 6 campioni la media delle catture è risultata essere di 140 zanzare a settimana (83% *Aedes albopictus* e 17% *Culex pipiens*); nel 7° e 8° campione, costituiti rispettivamente da 63 e 8 zanzare, *Culex pipiens* ha rappresentato il 67,6% delle zanzare totali e *Aedes albopictus* il 32,4% . Gli ultimi due campioni, il 9° e il 10°, prelevati nelle prime due settimane di Novembre, contenevano solo altri insetti.

Il campione di *Culex pipiens* prelevato il 7 Ottobre 2009 nella trappola predisposta presso questo sito è risultato positivo per *Usutu virus*, rilevato e confermato attraverso sequenziamento parziale del gene che codifica per l'NS5. Gli altri campioni sono risultati negativi per *Usutu virus*, mentre tutti i campioni sono risultati negativi sia per WNV che per JEV.

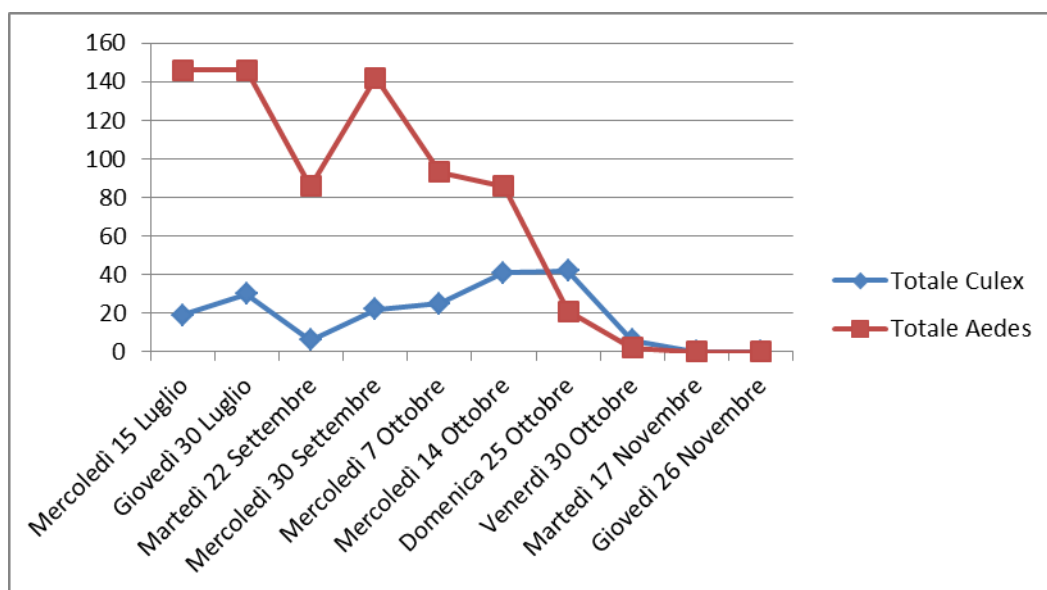


Grafico 1: Catture delle zanzare nel sito “Migliarino”, anno 2009

Totale zanzare (Migliarino 2009)

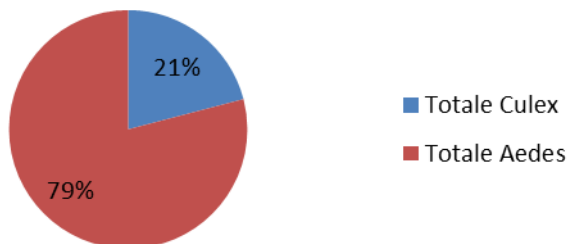


Grafico 2: Rapporto tra le specie di zanzara catturate nel sito “Migliarino”, anno 2009

| Data | Totale <i>Culex</i> | Totale <i>Aedes</i> | Esito Ist. Zooprofilattico |
|----------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------|
| Mercoledì 15 Luglio | 19 | 146 | Neg |
| Giovedì 30 Luglio | 30 | 146 | Neg |
| Martedì 22 Settembre | 6 | 86 | Neg |
| Mercoledì 30 Settembre | 22 | 142 | Neg |
| Mercoledì 7 Ottobre | 25 | 93 | Pos |
| Mercoledì 14 Ottobre | 41 | 86 | Neg |
| Domenica 25 Ottobre | 42 | 21 | Neg |
| Venerdì 30 Ottobre | 6 | 2 | Neg |
| Martedì 17 Novembre | 0 | 0 | Neg |
| Giovedì 26 Novembre | 0 | 0 | Neg |
| TOTALE | 191 | 722 | |

Tabella 4: Registrazione delle zanzare catturate nel sito “Migliarino”, anno 2009. In rosso il campione risultato positivo per *virus Usutu*

Nell'anno 2010 sono state rilevate, nel corso delle 8 catture effettuate, le stesse due specie di zanzara dell'anno precedente, di cui 233 *Culex pipiens* e 118 *Aedes albopictus*, rispettivamente il 66,4% e il 33,6%. Nelle prime 4 catture la media risulta essere stata di 80 zanzare a settimana con il 63,2% di *Culex pipiens* il 36,8% di *Aedes albopictus* mentre nelle altre catture il numero è diminuito drasticamente; dal 26 Ottobre non sono state più catturate zanzare del genere *Aedes*, la media delle zanzare catturate settimanalmente era di 5 e i gruppi erano composti prevalentemente da altri insetti.

Tutti i campioni raccolti in queste catture sono risultati negativi alle prove per USUV, JEV e WNV.

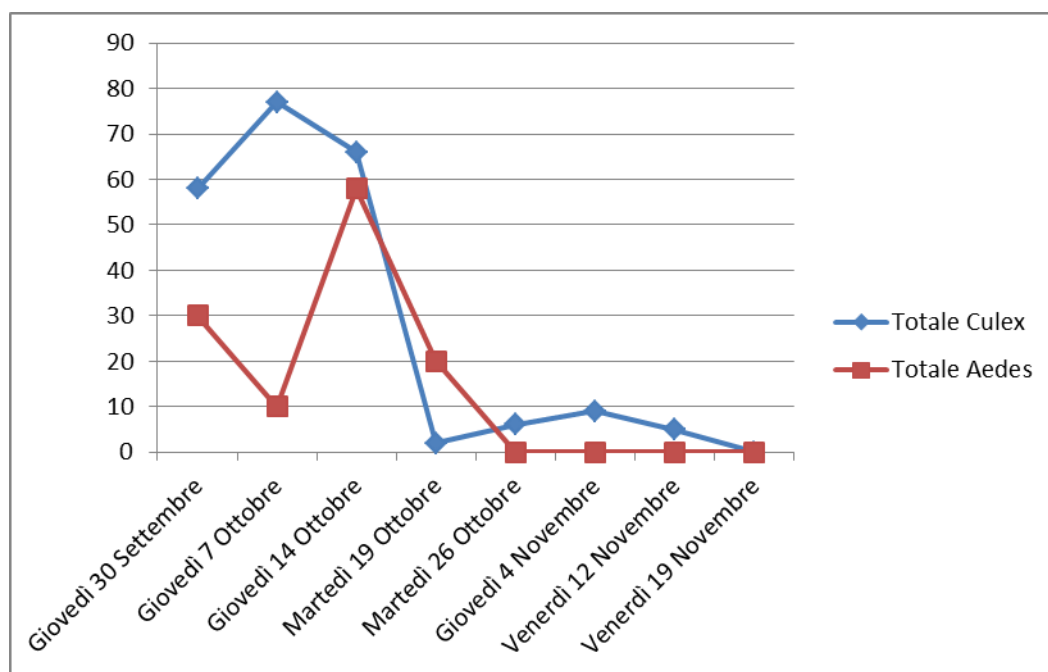


Grafico 3: Catture delle zanzare nel sito "Migliarino", anno 2010

Totale zanzare (Migliarino 2010)

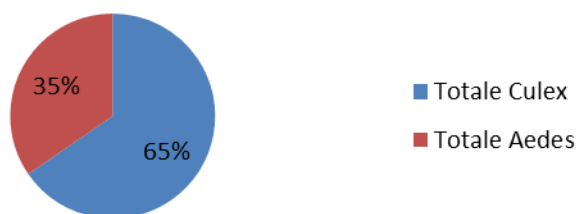


Grafico 4: Rapporto tra le specie di zanzara catturate nel sito “Migliarino”, anno 2010

| Data | Totale <i>Culex</i> | Totale <i>Aedes</i> | Esito Ist. Zooprofilattico |
|----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------|
| Giovedì 30 Settembre | 58 | 30 | Neg |
| Giovedì 7 Ottobre | 77 | 10 | Neg |
| Giovedì 14 Ottobre | 66 | 58 | Neg |
| Martedì 19 Ottobre | 2 | 20 | Neg |
| Martedì 26 Ottobre | 6 | 0 | Neg |
| Giovedì 4 Novembre | 9 | 0 | Neg |
| Venerdì 12 Novembre | 5 | 0 | Neg |
| Venerdì 19 Novembre | 0 | 0 | Neg |
| TOTALE | 223 | 118 | |

Tabella 5: Registrazione delle zanzare catturate nel sito “Migliarino”, anno 2010

Nel corso dell'anno 2011 nelle trappole piazzate sono state rinvenute le stesse specie di zanzare, *Aedes albopictus* e *Culex pipiens*, anche se nella trappola posizionata vicino all'allevamento equino è stato rinvenuto anche un alto numero di mosche. Gli insetti sono stati catturati ad intervalli di 5 giorni e sono stati prelevati 37 campioni totali nel sito. Il numero delle zanzare catturate è stato di 722, con una media di 20 esemplari per cattura. In questo sito le zanzare della specie *Culex pipiens* sono risultate essere il 62,2% del totale catturato, le *Aedes albopictus* il 37,8% del totale. Il numero di zanzare catturate ha avuto un picco nei mesi estivi, in particolare nel mese di Agosto. Dal mese di Ottobre non sono più state catturate zanzare del genere *Aedes*, e i campioni erano costituiti prevalentemente da altri insetti.

Le zanzare catturate in questo sito sono risultate essere negative agli esami di laboratorio sia per il virus USUV, che per JEV, che per WNV.

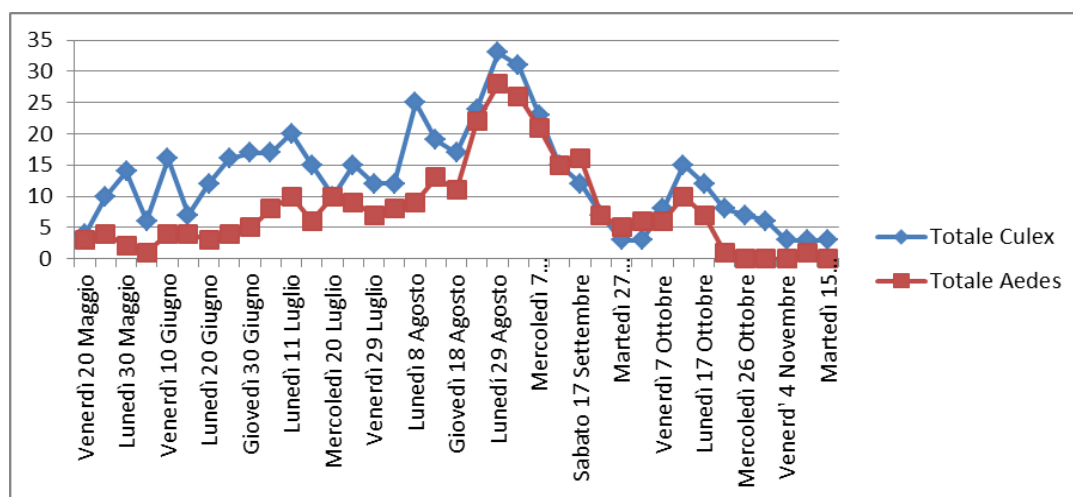


Grafico 5: Catture delle zanzare nel sito "Ospedale Didattico", anno 2011

Totale zanzare (Ospedale Didattico)

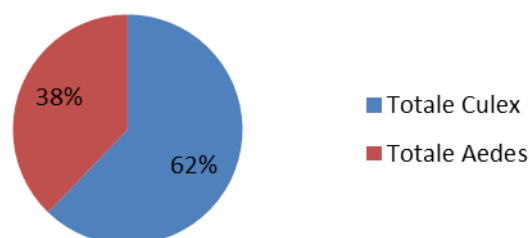


Grafico 6: Rapporto tra le specie di zanzara catturate nel sito "Ospedale Didattico", anno 2011

| Data | Totale <i>Culex</i> | Totale <i>Aedes</i> | Esito Ist. Zooprofilattico |
|-----------------------|------------------------|------------------------|-------------------------------|
| Venerdì 20 Maggio | 4 | 3 | Neg |
| Giovedì 25 Maggio | 10 | 4 | Neg |
| Lunedì 30 Maggio | 14 | 2 | Neg |
| Lunedì 6 Giugno | 6 | 1 | Neg |
| Venerdì 10 Giugno | 16 | 4 | Neg |
| Mercoledì 15 Giugno | 7 | 4 | Neg |
| Lunedì 20 Giugno | 12 | 3 | Neg |
| Sabato 25 Giugno | 16 | 4 | Neg |
| Giovedì 30 Giugno | 17 | 5 | Neg |
| Martedì 5 Luglio | 17 | 8 | * |
| Lunedì 11 Luglio | 20 | 10 | * |
| Sabato 16 Luglio | 15 | 6 | * |
| Mercoledì 20 Luglio | 10 | 10 | * |
| Lunedì 25 Luglio | 15 | 9 | * |
| Venerdì 29 Luglio | 12 | 7 | * |
| Mercoledì 3 agosto | 12 | 8 | * |
| Lunedì 8 Agosto | 25 | 9 | * |
| Sabato 13 Agosto | 19 | 13 | * |
| Giovedì 18 Agosto | 17 | 11 | * |
| Martedì 23 Agosto | 24 | 22 | * |
| Lunedì 29 Agosto | 33 | 28 | * |
| Venerdì 2 Settembre | 31 | 26 | * |
| Mercoledì 7 Settembre | 23 | 21 | * |
| Lunedì 12 Settembre | 15 | 15 | * |
| Sabato 17 Settembre | 12 | 16 | * |
| Giovedì 22 Settembre | 7 | 7 | * |
| Martedì 27 Settembre | 3 | 5 | * |
| Lunedì 3 Ottobre | 3 | 6 | * |
| Venerdì 7 Ottobre | 8 | 6 | * |
| Mercoledì 12 Ottobre | 15 | 10 | * |
| Lunedì 17 Ottobre | 12 | 7 | * |
| Venerdì 21 Ottobre | 8 | 1 | * |
| Mercoledì 26 Ottobre | 7 | 0 | * |
| Lunedì 31 Ottobre | 6 | 0 | * |
| Venerdì 4 Novembre | 3 | 0 | * |
| Giovedì 10 Novembre | 3 | 1 | * |
| Martedì 15 Novembre | 3 | 0 | * |
| TOTALE | 480 | 292 | |

Tabella 6: Registrazione delle zanzare catturate nel sito "Ospedale Didattico", anno 2011

*: Controlli in corso

Presso il podere “Le Querciole”, sono stati raccolti 35 campioni totali. Il numero delle zanzare catturate è stato di 795, appartenenti sia alla specie *Culex pipiens* che alla specie *Aedes albopictus*, mentre la presenza di altri insetti come le mosche era sporadica e rilevabile solamente nelle ultime catture. La media delle zanzare per cattura è stata di 22 esemplari, *Culex pipiens* costituiva il 44% del totale catturato, *Aedes albopictus* il 56%.

Il numero di zanzare catturate ha avuto un picco nel mese di Agosto e la specie *Aedes albopictus* ha tendenzialmente superato numericamente l'altra, anche se questa specie non è più stata catturata dall'inizio del mese di Novembre.

I campioni raccolti in queste catture sono risultati negativi per WNV, JEV e USUV.

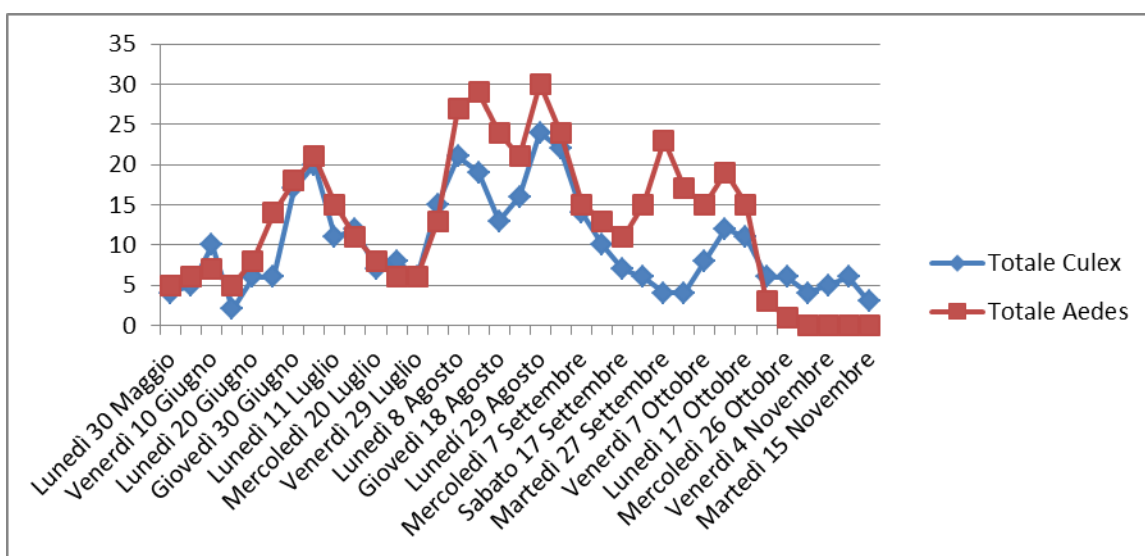


Grafico 7: Catture delle zanzare nel sito “Le Querciole”, anno 2011

Totale zanzare (Le Querciole)

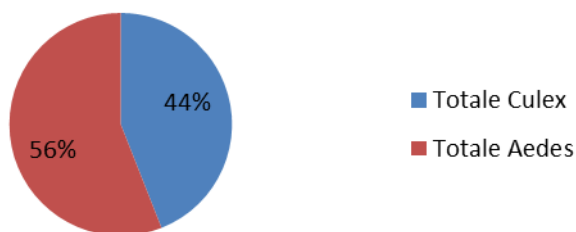


Grafico 8: Rapporto tra le specie di zanzara catturate nel sito “Le Querciole”, anno 2011

| Data | Totale <i>Culex</i> | Totale <i>Aedes</i> | Esito Ist. Zooprofilattico |
|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| Lunedì 30 Maggio | 4 | 5 | Neg |
| Lunedì 6 Giugno | 5 | 6 | Neg |
| Venerdì 10 Giugno | 10 | 7 | Neg |
| Mercoledì 15 Giugno | 2 | 5 | Neg |
| Lunedì 20 Giugno | 6 | 8 | Neg |
| Sabato 25 Giugno | 6 | 14 | Neg |
| Giovedì 30 Giugno | 17 | 18 | Neg |
| Martedì 5 Luglio | 20 | 21 | Neg |
| Lunedì 11 Luglio | 11 | 15 | * |
| Sabato 16 Luglio | 12 | 11 | * |
| Mercoledì 20 Luglio | 7 | 8 | * |
| Lunedì 25 Luglio | 8 | 6 | * |
| Venerdì 29 Luglio | 6 | 6 | * |
| Mercoledì 3 agosto | 15 | 13 | * |
| Lunedì 8 Agosto | 21 | 27 | * |
| Sabato 13 Agosto | 19 | 29 | * |
| Giovedì 18 Agosto | 13 | 24 | * |
| Martedì 23 Agosto | 16 | 21 | * |
| Lunedì 29 Agosto | 24 | 30 | * |
| Venerdì 2 Settembre | 22 | 24 | * |
| Mercoledì 7 Settembre | 14 | 15 | * |
| Lunedì 12 Settembre | 10 | 13 | * |
| Sabato 17 Settembre | 7 | 11 | * |
| Giovedì 22 Settembre | 6 | 15 | * |
| Martedì 27 Settembre | 4 | 23 | * |
| Lunedì 3 Ottobre | 4 | 17 | * |
| Venerdì 7 Ottobre | 8 | 15 | * |
| Mercoledì 12 Ottobre | 12 | 19 | * |
| Lunedì 17 Ottobre | 11 | 15 | * |
| Venerdì 21 Ottobre | 6 | 3 | * |
| Mercoledì 26 Ottobre | 6 | 1 | * |
| Lunedì 31 Ottobre | 4 | 0 | * |
| Venerdì 4 Novembre | 5 | 0 | * |
| Giovedì 10 Novembre | 6 | 0 | * |
| Martedì 15 Novembre | 3 | 0 | * |
| TOTALE | 350 | 445 | |

Tabella 7: Registrazione delle zanzare catturate nel sito "Le Querciole", anno 2011

* Controlli in corso

Nel corso di tutte le catture effettuate sono state raccolte un totale di 3521 zanzare suddivise in 1244 della specie *Culex pipiens* e 1577 della specie *Aedes albopictus*. Analizzando le catture totali effettuate nel corso dei tre anni in tutti i siti, notiamo che la percentuale di zanzare della specie *Aedes albopictus* supera quella delle zanzare *Culex pipiens*, poiché le loro percentuali sono di 54% e 46%, rispettivamente.

Totale zanzare (tutte le catture)

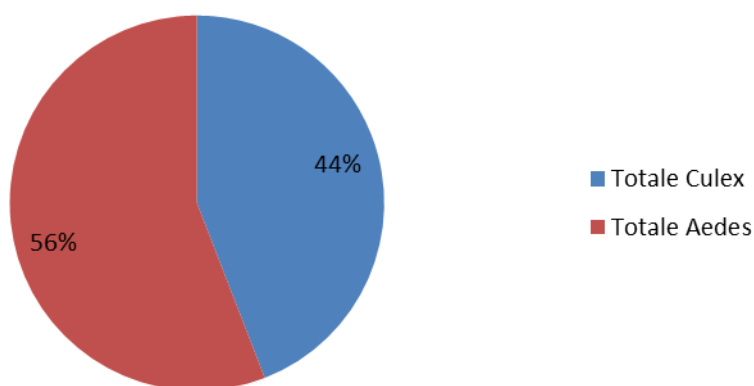


Grafico 9: Rapporto tra le specie di zanzara catturate in totale nei tre siti nel corso degli anni 2009, 2010 e 2011.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I punti in cui sono state piazzate le trappole si differenziano molto per la vegetazione, gli animali che vivono nei paraggi e le caratteristiche idrogeologiche.

Tutto questo può influire sulla quantità e sulle specie di zanzare che possiamo trovare. I risultati sono molto variabili tra i siti, sia per numero di zanzare che per rapporto tra le due specie catturate, *Culex pipiens* e *Aedes albopictus*. Considerando le loro caratteristiche biologiche e considerando il fatto che gli adulti di nessuna delle due specie si allontanano molto dal luogo dello sfarfallamento, posizionare una trappola anche a distanza di pochi chilometri da un'altra può cambiare notevolmente i risultati delle catture, come successo con i siti "Ospedale Didattico" e "Le Querciole".

A "Migliarino", nel corso dell'anno 2009, notiamo una netta prevalenza delle zanzare del genere *Aedes* rispetto a quella delle zanzare del genere *Culex* tranne per l'ultimo periodo dell'anno (Novembre).

Il numero molto più alto di *Aedes* rispetto a quello di *Culex* nella stagione più calda potrebbe dipendere dal fatto che la trappola è stata posizionata in prossimità di una abitazione.

Dalla biologia delle due specie infatti *Culex pipiens* depone prevalentemente in fossi, stagni, piccoli laghi, mentre *Aedes albopictus* depone su superfici solide ma umide, in particolar modo in ambiente peridomestico nei sottovasi, recipienti lasciati fuori casa, bacinelle o docce per la raccolta dell'acqua piovana.

Il campione delle zanzare di *Culex pipiens* prelevato il 7 Ottobre 2009 è risultato positivo per *virus Usutu*. Tutti gli altri campioni sono risultati negativi per quel virus. Tutti i campioni raccolti sono inoltre risultati negativi sia per WNV che per JEV.

La trappola dove è stata trovata la positività a *virus Usutu* si trovava presso un'abitazione con un cavallo e un asino. Quest'ultimo era risultato dubbio al test di screening sierologico, test

ELISA competitivo per JE Group virus. Proprio per verificare l'effettiva circolazione di virus JE Group in quest'area era stato deciso di posizionare la trappola per la cattura delle zanzare. La positività delle zanzare ha confermato la presenza di USUV nell'area di studio come riportato nel documento di risposta del CESME (Prot 2305 del 8 Marzo 2010):

"I risultati virologici evidenziano una circolazione del virus Usutu nel Parco naturale di Migliarno San Rossore Massaciuccoli, area di provenienza dei campioni esaminati. Il virus è stato rilevato in un pool di Culex pipiens mediante RT-PCR specifica e confermato attraverso sequenziamento parziale del gene che codifica per l'NS5 [...]. La presenza del virus Usutu non è nuova in Toscana, come dimostrano le sierconversioni riscontrate in cavalli sentinella delle province di Lucca e Pistoia nell'ambito del piano di sorveglianza per il virus della West Nile."

Questo risultato di positività viene inoltre riportato in *"Usutu virus in Italy: an emergence or a silent infection?"* da Savini et al. in *Veterinary Microbiology* nel 2011.

Nel corso dell'anno 2010 notiamo che nello stesso sito ("Migliarino") il numero di zanzare del genere *Culex* è maggiore rispetto a quello del numero di *Aedes*: essendo le condizioni geografiche le stesse dell'anno precedente, questa differenza potrebbe essere dovuta al nostro intervento di sensibilizzazione delle persone dell'abitazione a non lasciare ristagni d'acqua come sottovasi o bacinelle. Ma la spiegazione più plausibile potrebbe essere stata il fatto che nell'anno 2010 le catture sono iniziate soltanto nell'ultimo periodo dell'anno, dalla fine del mese di Settembre. Nel corso dell'anno 2010 i campioni prelevati sono risultati negativi per USUV, JEV e WNV.

All' "Ospedale Didattico" di S. Piero a Grado le catture sono state effettuate dal mese di Maggio a quello di Novembre, e questo ha consentito di poter avere una panoramica generale sull'andamento in tutto il periodo dell'attività delle zanzare. C'è da notare che in questa trappola sono state catturate molte mosche, quasi assenti nelle catture effettuate negli altri siti; la causa potrebbe essere il fatto che in questo allevamento sono presenti circa 30 cavalli e 10 asini che potrebbero aver attirato questi insetti. Il numero delle zanzare è

rimasto basso agli inizi di Maggio per poi avere un picco nel mese di Agosto e tornare a numeri più bassi nel mese di Novembre. In questo sito, il numero delle zanzare *Culex* rispetto ad *Aedes* è stato tendenzialmente superiore, anche se non c'è stata una netta prevalenza significativa delle une rispetto alle altre.

La superiorità numerica delle zanzare *Culex* potrebbe dipendere dal fatto che l'Ospedale nei pressi del quale è stata piazzata la trappola è la sola struttura nel raggio di alcuni chilometri e che intorno sono presenti solamente campi coltivati. Queste zanzare potrebbero aver proliferato nell'acqua stagnante dei campi irrigati ed essersi nutrite del sangue di animali al pascolo. Le zanzare del genere *Aedes* trovano invece in questo sito un ambiente piuttosto sfavorevole in quanto non caratterizzato da elevata umidità: si tratta di un luogo piuttosto ventoso dove non sono presenti recipienti o sistemi di raccolta delle acque (tranne gli abbeveratoi degli animali che però vengono quotidianamente cambiati). Il picco che possiamo notare nelle stagioni calde è probabilmente dovuto al clima, che favorisce il proliferare di questi insetti, mentre il basso numero di esemplari catturati a Maggio e a Novembre è causato dalle basse temperature tipiche di questi periodi. Nelle zanzare catturate non è stata rilevata positività ad alcun virus del JE Group. La trappola era stata posizionata in questo sito per la presenza di numerosi equidi, ospiti a fondo cieco per vari virus del gruppo.

Nel podere "Le Querciole" l'andamento stagionale delle zanzare è simile a quello che possiamo osservare nel sito precedente anche se al contrario le zanzare del genere *Aedes* superano le zanzare del genere *Culex*. Le condizioni climatiche del podere sono molto simili a quelle dell' "Ospedale Didattico" in quanto la distanza tra i due siti è esigua, anche se l'ambiente delle "Querciole" è diverso da quello dell' "Ospedale Didattico".

"Le Querciole" è al confine di un bosco caratterizzato dalla vegetazione tipica del Parco Naturale in cui vivono animali selvatici; inoltre presso questo sito è presente un allevamento di avicoli (polli, faraone, fagiani) e uno di conigli. Queste caratteristiche fanno sì che l'ambiente sia più umido rispetto a quello del sito "Ospedale Didattico" e il fatto che sia presente una forte attività antropica attira sicuramente le zanzare del genere *Aedes*. Le

zanzare del genere *Culex* trovano un ambiente favorevole alla deposizione a causa dei fossati e dei vari contenitori di natura antropica lasciati all'esterno della struttura. Nelle zanzare catturate a "Le Querciole" non sono state rilevate positività a virus del JE Group. La trappola è stata posizionata in questo sito per la presenza di avicoli di allevamento potenziali ospiti serbatoio per vari virus del gruppo.

Per quanto riguarda la valutazione della presenza dei virus appartenenti a JE Group nell'area di studio dal 1996, il controllo della popolazione recettiva ai virus del gruppo sul territorio è stato effettuato dagli anni precedenti la nostra indagine in collaborazione con i due più importanti Centri Di Recupero della Toscana, uno nell'interno molto vicino al Padule di Fucecchio (CSN di Prato) e uno sulla costa a pochi chilometri dal Parco Naturale di Migliarino San Rossore Massaciuccoli (CRUMA di Livorno). Dal 1997 al 2011 infatti la maggior parte degli uccelli morti raccolti nei due Centri sono stati recapitati al Laboratorio di Patologia Aviare della Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa. Tutti gli uccelli selvatici sono stati sottoposti a necropsia con particolare riferimento alle lesioni caratteristiche delle patologie indotte da virus del gruppo encefalite giapponese. Dopo 10 anni di controlli costantemente negativi, che facevano pensare alla scomparsa dei virus dall'ambiente, per avvalorare l'ipotesi che tali virus fossero comunque presenti è stato utilizzato un test di screening su popolazioni potenzialmente recettive: fagiani, anatre, cinghiale ed equidi.

La positività sierologica in fagiani di allevamento in un CPS sito nel Parco e le negatività riscontrate negli allevamenti posti in altre zone della Toscana ha permesso di individuare particolari fattori di rischio (vedi parte generale) e concentrare i successivi controlli ad un'area di studio più limitata, il Parco Naturale di Migliarino San Rossore Massaciuccoli.

La prevalenza in anatre da richiamo, che sono state portate in area preparco molto vicina al lago di Massaciuccoli, in Appostamento Fisso di Caccia agli Acquatici, ha evidenziato come particolare fattore di rischio possa essere la convivenza con uccelli acquatici selvatici potenzialmente infettati soprattutto di notte, quando la presenza delle zanzare è maggiore.

Inoltre in questa area di studio si ha un'elevata presenza di cinghiali che possono raggiungere una densità di popolazione spesso superiore a 5 soggetti per Km². Questi animali sono i principali ospiti amplificatori di JEV. La positività a JE Group rilevata nel corso degli studi effettuati in questi anni ha evidenziato e confermato il particolare ruolo epidemiologico di *Sus scrofa* come ospite amplificatore di JEV, essendo l'unico virus del gruppo che trova in questa specie animale il suo principale ospite amplificatore. Questo rende di valore diagnostico differenziale la positività rilevata in questa specie nell'area di studio.



Figura 51: Promiscuità tra un cinghiale (*Sus scrofa*), ospite amplificatore di JEV, e degli equidi nell'area del Parco. Gli equidi sono una specie recettiva per questo virus.

Ricerche analoghe a quelle condotte nei cinghiali del Parco sono state effettuate a Singapore e in Giappone. Anche in questi due paesi la prevalenza sierologica ha evidenziato il ruolo del cinghiale nella diffusione di JEV (See et al., 2002; Ohno et al., 2009).

Riguardo agli equidi, anche se il numero dei soggetti esaminati è ad oggi limitato, si segnala la positività nel cavallo e un risposta dubbia nell'unico asino sottoposto a controllo.

In generale, riguardo alla diffusione di JE Group virus in Italia, riteniamo opportuno ricordare, oltre alla pubblicazione di Savini et al. del 2011 citata precedentemente, la segnalazione di Ravanini et al. (2012) che riporta il ritrovamento di RNA appartenente a JEV e USUV in zanzare in Emilia Romagna (vedi testo originale allegato 1). Altro lavoro da citare quello di Platonov et al. che nel 2012, confrontando l'RNA virale di JEV rilevato in merli e altri passeriformi morti nell'episodio del 1996 nel Padule di Fucecchio con quello ritrovato in

zanzare da Ravanini et al. 2012 rilevano che le sequenze nucleotidiche differiscono solo per due posizioni (vedi testo originale allegato 2). Infine, uno studio di Weissenböck et al. nel 2013 basato su un'indagine retrospettiva segnala che su tessuti di uccelli morti raccolti in Toscana nell'episodio del 1996 è stato rilevato USUV in tessuti e organi di merli (vedi testo originale allegato 3).

Queste recenti pubblicazioni confermano l'interesse per i virus del gruppo encefalite giapponese e ne dimostrano la diffusione in Europa.

Japanese encephalitis virus RNA detected in *Culex pipiens* mosquitoes in Italy

P Ravanini (paolo.ravanini@gmail.com)¹, E Huhtamo², V Ilaria¹, M G Crobu¹, A M Nicosia¹, L Servino³, F Rivasi³, S Allegrini⁴, U Miglio⁴, A Magri⁵, R Minisini⁵, O Vapalahti², R Boldorini⁴

1. Laboratory of Molecular Virology, Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità, Novara, Italy
2. Infection Biology Research Programme, Department of Virology, Haartman Institute, Faculty of Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland
3. Department of Diagnostics, Laboratory Service and Forensic Medicine, Section of Pathological Anatomy, University of Modena and Reggio Emilia, Italy
4. Department of Pathological Anatomy, Faculty of Medicine and Surgery, University Amedeo Avogadro del Piemonte Orientale, Novara, Italy
5. Department of Translational Medicine, University of Eastern Piedmont 'Amedeo Avogadro', Novara, Italy

Citation style for this article:

Ravanini P, Huhtamo E, Ilaria V, Crobu MG, Nicosia AM, Servino L, Rivasi F, Allegrini S, Miglio U, Magri A, Minisini R, Vapalahti O, Boldorini R. Japanese encephalitis virus RNA detected in *Culex pipiens* mosquitoes in Italy. *Euro Surveill.* 2012;17(28):pii=20221. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20221>

Article submitted on 4 July 2012 / published on 12 July 2012

Mosquitoes collected in northern Italy were screened for flavivirus RNA. Positive amplicons were sequenced and found most similar to insect flavivirus (ISF), Usutu virus (USUV) and surprisingly also to Japanese encephalitis virus (JEV). The sequence (167 bp), obtained from one pool of *Culex pipiens*, was found identical to JEV strains from bats in China. Unfortunately additional sequence data or virus isolations were not obtained in this study. Confirmation of potential introduction of JEV to Italy and other European countries is urgently needed.

In the course of a small-scale preliminary study screening for the presence of flavivirus RNA in mosquitoes in Italy, we obtained sequences of three different flaviviruses; an insect-specific flavivirus (ISF) related to cell fusing agent virus, Usutu virus (USUV) and, to our surprise, also of Japanese encephalitis virus (JEV). While ISF and USUV have been documented previously in Italy and several other European countries [1,2], JEV has, to our knowledge, not been detected in mosquitoes in Europe so far. JEV is a mosquito-borne flavivirus known to be endemic in Asia, extending to India and Pakistan in the west, where it is a leading cause of encephalitis. Although commercial inactivated vaccines are available against JEV, it causes an estimated annual number of 30,000–50,000 cases worldwide [3]. The majority of the infections are subclinical, but up to 30% of symptomatic patients die, and 30% of the survivors have persistent neurological sequelae [3]. The life cycle of JEV includes *Culex* spp. mosquitoes and water birds or pigs, but JEV also infects a wide range of other vertebrates. In addition to humans, horses may develop encephalitis and are considered dead-end hosts for JEV transmission [4].

Sample collection

Following the active circulation of WNV and USUV, the recent detection of novel ISFs in Italy and elsewhere in Europe, and the detection of dengue virus in southern France and Croatia [1,7,10,11], the aim of this study was to screen mosquitoes for flavivirus RNA using a system allowing the detection of all flaviviruses. Female mosquitoes were collected in late summer of 2010 and 2011 in rural areas near Modena and Bologna in Emilia-Romagna region (Figure 1), using CO₂-baited traps.

Mosquitoes were identified using morphological characteristics [5], pooled by species (identification at sub-species level was not done), date and site of collection (with a maximum of 27 individuals per pool) and stored at -80°C until processed. The mosquito species collected included mainly *C. pipiens*, and additionally *Aedes albopictus*, *A. caspius* and *A. vexans*. A total of 62 pools were studied; 52 had been collected in 2010 (all *C. pipiens*) and 10 in 2011 (five *C. pipiens*).

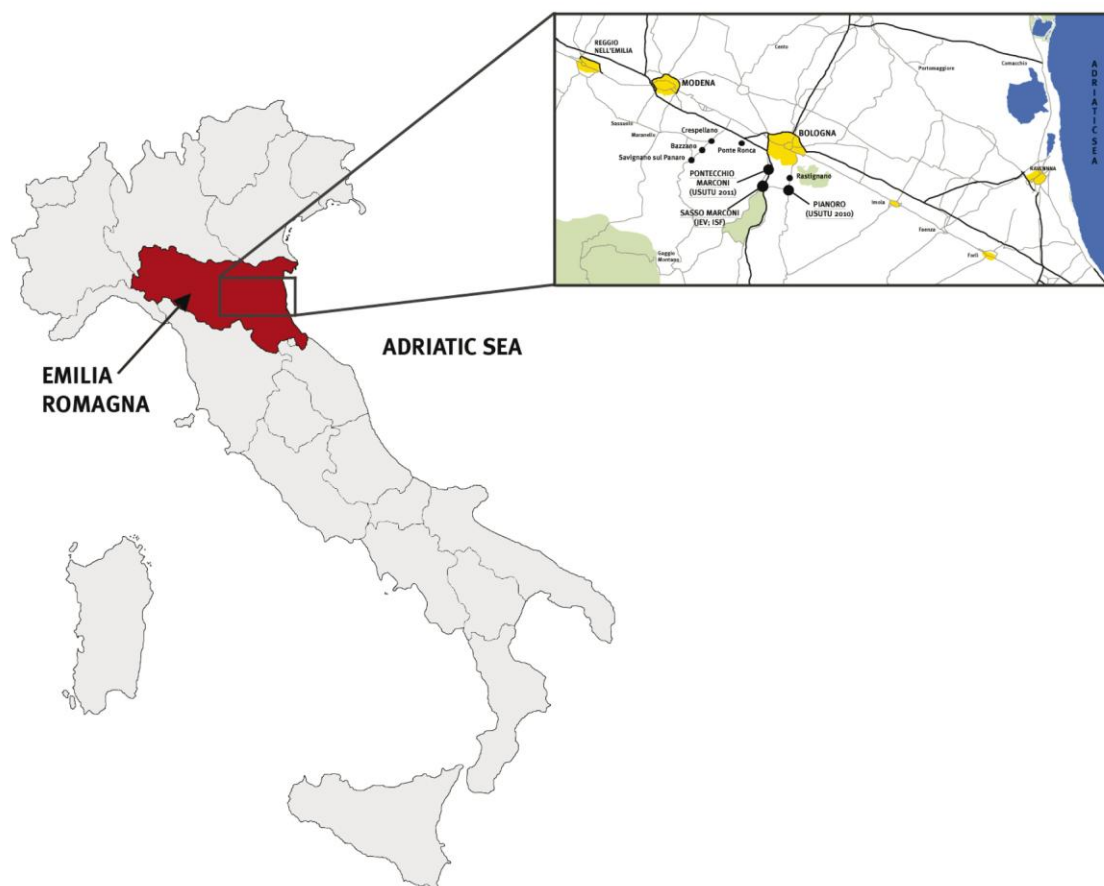
Molecular analysis

The mosquitoes were ground manually using sterile sand and Dulbecco's phosphate-buffered saline. Nucleic acids were extracted using EasyMag (bioMérieux) and examined by RT-PCR targeted to a conserved region of the flavivirus NS5 gene [6]. The PCR products were sequenced directly and cloned when necessary (CloneJET PCR Cloning Kit, Fermentas). The obtained sequences were identified using BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Of the 62 pools, five were found positive for flavivirus RNA. The sequences (Box) were identified as (i) ISF from *A. albopictus*, 2011 (two sequences; lengths 133 and 87 bp; identical in the overlapping region), (ii) USUV from *C. pipiens*, 2010 and 2011 (two sequences; lengths 133 and 167 bp; identical in the overlapping

FIGURE 1

Mosquito collection locations, Italy, summer 2010 and 2011



The black dots represent the eight collection sites near Bologna and Modena.

region) and (iii) JEV (one sequence; 167 bp) from one pool of *C. pipiens*, 2010 (Figure 2). The ISF (collected in Sasso Marconi) and USUV (collected in Pontecchio Marconi and Pianoro) sequences were identical to other sequences previously reported from Italy [1,7]. The JEV sequence (genomic position: 9,109–9,275) was obtained from mosquitoes collected in Sasso Marconi. It showed 100% similarity to four sequences in Genbank, all of them representing JEV genotype III viruses isolated from bats in China between 1986 and 2009 (JN711458, JN711459, JF706285, JF185036).

The PCR product yielding the NS5 sequence related to JEV was amplified from the original material twice and sequenced in three separate laboratories. Additional sequence data would be needed for detailed

characterisation of the viral strain and sequence analysis, but unfortunately the attempts to amplify longer sequences from the JEV-positive pool using primers targeted to E, NS5 and NS3 regions in nested and semi-nested protocols remained negative. Attempts to isolate the virus from the JEV- and USUV-positive pools on Vero and on C6/36 insect cells were not successful.

Discussion

While the potential risk of JEV spreading to Europe has been acknowledged before [8], and despite the active surveillance for flaviviruses such as WNV and USUV, to the best of our knowledge, this is the first report of a JEV-like sequence in mosquitoes in Europe. The JEV-like sequence was detected within a small scale preliminary study, and some details of the field work along

Box

Viral nucleotide sequence fragments obtained from mosquitoes collected in Italy, summer 2010 and 2011 (n=3)

JEV_pool_M20 167 bp

```
TCATGTGGCTTGGAGCACGGTATCTAGAGTTTGAAGCTTTGGGGTTCCT
GAATGAAGACCATTGGCTGAGCCGAGAGAATTGAGGAGTGGAGTGG
AAGGCTCAGGCGTCCAAAAGCTAGGATACATCCTCCGTGACATAGCAGG
AAAGCAAGGAGGGAAAATGTAC
```

USUV_pool_M7 167 bp

```
TCATGTGGCTAGGCGCCAGATTCTGGAGTTTGAAGCTCTGGGCTTTCT
GAATGAGGACCATTGGTTAGGAAGAAAGAAATTCTGGAGGAGTGGT
AAGGACTTGGTGCCAAAACCTGGTTACATTCTGCGTGAGATGAGCC
ACCATTGAGTGGGAAAATGTAC
```

ISF_pool_M2B 133 bp

```
CTCGGAAGTCGTTTTCTGGAATTTGAGGCCCTTGGGGTTCTTAAAT
GCTGATCACTGGGTCAGTCGTGAAAACCTTCTGGGGGCGTGGGT
GGAGTGGGTGTAATTACTTTGGCACTACCTAAAGGAAATTT
```

with mosquito subspecies identification were unfortunately not documented in detail. Laboratory contamination as the source of the obtained JEV sequence was highly unlikely, as no JEV virus, RNA or PCR products had ever been handled in the laboratories where the mosquitoes were processed or where the RT-PCRs were performed. Interestingly, Mani et al. have reported detecting in 1996-97 JEV antibodies and RNA in Italian birds [9], but unfortunately no further information is currently available about the sequences found in that study.

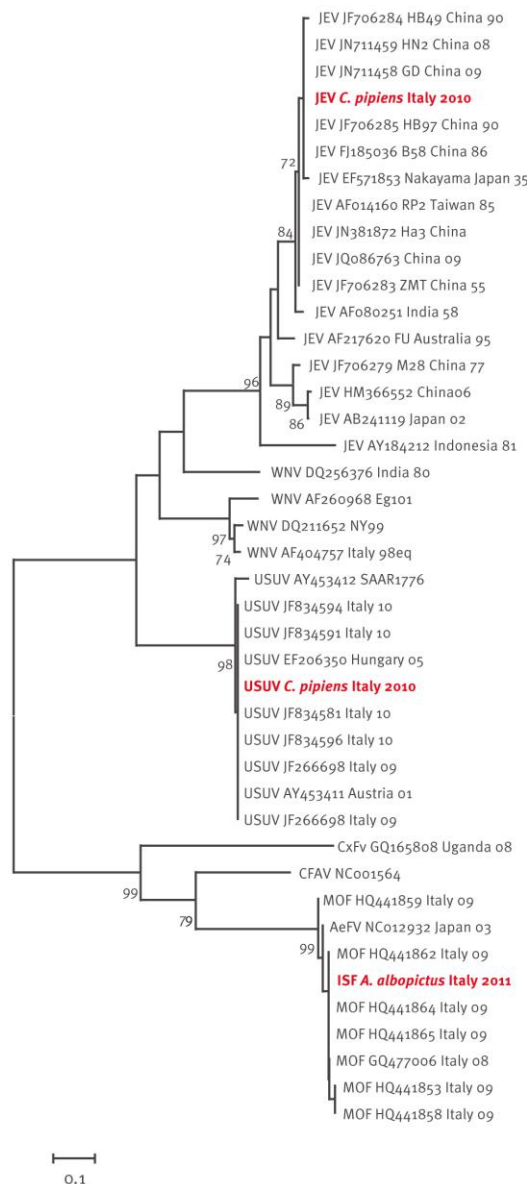
Recently, autochthonous dengue virus (DENV) infections have been detected in France [10] and Croatia [11]. While these viruses are most likely to have been imported there from endemic regions, most probably through viraemic travellers or via materials harbouring infected mosquitoes, eggs or larvae, JEV could have been introduced to Italy through waterfowl or wild waterbirds. Future arbovirus surveillance should include JEV-specific or pan-flavivirus detection methods, and it should be noted that due to cross-reactions, serological assays with the exception of seroneutralisation are probably unable to differentiate an immune response to JEV from one to WNV and USUV.

Conclusions

A partial genomic sequence of JEV was detected in Italian *C. pipiens* mosquitoes for the first time, but confirmation of the finding by additional sequence data or virus isolation has not yet been successful. The authors are aware that these findings are preliminary, and confirmation of the results is necessary. Further evidence of JEV circulation is required for evaluating the possible need for precautionary measures against JEV transmission in Italy and other European countries.

FIGURE 2

Phylogenetic tree based on a 122 bp region of flavivirus NS5 sequences obtained from mosquitoes collected in Italy, summer 2010 and 2011 (n=3)



ISF: insect-specific flavivirus; JEV: Japanese encephalitis virus; USUV: Usutu virus.

Mosquito pools positive for JEV and ISF were collected at Sasso Marconi, and pools positive for USUV from Pontecchio Marconi and Pianoro. The neighbour-joining phylogenetic tree was estimated using maximum composite likelihood model, including 1,000 bootstrap replicates using programme Mega.

Acknowledgments

We thank Alberto Palandri for the graphic support.

References

1. Calzolari M, Zé-Zé L, Ruzek D, Vázquez A, Jeffries C, Defilippo F, et al. Detection of mosquito-only flaviviruses in Europe. *J Gen Virol.* 2012;93(Pt6):1215-25.
2. Vazquez A, Jimenez-Clavero M, Franco L, Donoso-Mantke O, Sambri V, Niedrig M, et al. Usutu virus – potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill.* 2011;16(31):pii=19935. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19935>
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Japanese encephalitis Factsheet. Atlanta: CDC. [Accessed 11 July 2012]. Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/jencephalitis/facts.htm>
4. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med.* 2004;10(12 Suppl):S98-109.
5. Schaffner E, Angel G, Geoffroy B, Hervy JP, Rhaïem A, Brunhes J. The Mosquitoes of Europe. CD-ROM. CD-ROM. Montpellier: Institut de Recherche pour le Développement/Entente interdépartementale pour la démostication du littoral (EID) Méditerranée ; 2001.
6. Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J Clin Microbiol.* 2001;39(5):1922-7.
7. Calzolari M, Gaibani P, Bellini R, Defilippo F, Pierro A, Albieri A, et al. Mosquito, Bird and Human Surveillance of West Nile and Usutu Viruses in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2010. *PLoS One.* 2012;7(5):e38058.
8. Pfeffer M, Dobler G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasit Vectors.* 2010;8(3):35.
9. Mani P, Legrottaglie R, Bertelloni F, Fratini F, Filogari D, Rossi G. Il Virus dell'Encefalite Giapponese (JEV) in uccelli selvatici sinantropici (*Passer italiae*, *Turdus merula*, *Sturnus vulgaris*) e da richiamo (*Turdus ilacus*) in Toscana. [The Japanese encephalitis virus (JEV) in synanthropic wild birds (*Passer italiae*, *Turdus merula*, *Sturnus vulgaris*) and redwing (*Turdus ilacus*) in Tuscany]. *Ecologia Urbana.* 2009;21(1):99-100. Italian.
10. La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, et al. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill.* 2010;15(39):pii=19676. Available from: <http://www.eurosurveillance.org>
11. Schmidt-Chanasit J, Haditsch M, Schoneberg I, Gunther S, Stark K, Frank C. Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. *Euro Surveill.* 2010;15(40):pii=19677. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19677>.

Does the Japanese encephalitis virus (JEV) represent a threat for human health in Europe? Detection of JEV RNA sequences in birds collected in Italy.

A E Platonov¹, G Rossi², L S Karan¹, K O Mironov¹, L Busani³, G Rezza (giovanni.rezza@iss.it)³

1. Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

2. School of Veterinary Medical Science, University of Camerino, Matelica, Italy

3. Istituto Superiore di Sanità (ISS, National Institute of Health), Rome, Italy

Citation style for this article:

Platonov AE, Rossi G, Karan LS, Mironov KO, Busani L, Rezza G. Does the Japanese encephalitis virus (JEV) represent a threat for human health in Europe? Detection of JEV RNA sequences in birds collected in Italy. *Euro Surveill.* 2012;17(32):pii=20241. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20241>

Article submitted on 30 July 2012 / published on 9 August 2012

To the editor:

Autochthonous cases of Japanese encephalitis (JE) have never been reported in Europe, where there is virtually no circulation of the virus [1]. However, in the issue of *Eurosurveillance* published on 12 July 2012, Ravanini et al. [2] reported the detection of an RNA sequence of the Japanese encephalitis virus (JEV) NS5 gene in one pool of *Culex pipiens* mosquitoes collected in north-eastern Italy during the summer of 2010. Unfortunately, the sequence was relatively short (167 bp), and attempts to amplify longer sequences using primers targeted to E, NS5 and NS3 genes and to isolate the virus on cell cultures failed.

To support their findings, the authors cited a previous study reporting the identification of JEV RNA in bird samples collected in Tuscany, a neighbouring Italian region, a decade before [3], and noted the lack of information on viral sequences in that study. Here we provide the results of molecular testing on bird tissue samples, which appear to confirm recent findings on JEV presence in Italy.

Between 1997 and 2000 dead birds were collected to investigate episodes of bird mortality observed in Padule del Fucecchio, a wetland area in Tuscany where cases of West Nile virus (WNV) infection in horses were observed in 1998 [4]. The episodes involved mainly blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*Turdus philomelos*). Other species, less affected by mortality, were also sampled such as rock doves (*Columba livia*), redwings (*Turdus iliacus*), sparrows (*Passer italiae*), and starlings (*Sturnus vulgaris*).

In May 2001 formalin-fixed tissue samples from seven birds collected in 2000 that tested positive for JE group antigens by immunohistochemistry, were sent to the Central Research Institute of Epidemiology in Moscow, Russia to carry out molecular testing for flaviviruses. Later, in early 2003, samples from 14 birds collected in

1997 which had also tested positive, were sent to the same Institute.

The samples were subjected to RT-PCR assays, one targeting the nonstructural NS5 gene for the detection of most flaviviruses [5] and the other for detection of the WNV and JEV envelope (E) genes (the details of these in-house assays are available from the authors on request).

None of the samples tested positive for WNV, but PCR amplicons of the JEV NS5 gene (expected size, 215 bp) were obtained from tissues of six birds collected in 2000. Amplicons of the JEV E gene (expected size, 687 bp) were obtained from the same six birds and in one of the birds collected in 1997. Sequencing of 552 bp fragments of the JEV E gene from five of the samples (GenBank accession numbers AF501311-AF501315) and of NS5 amplicons from two samples showed maximum similarity (99%) with JEV genotype III, for example with the Nakayama strain [6].

Importantly, the JEV nucleotide sequence found in Italian *Culex pipiens* [2] differed from the JEV RNA sequence found in Italian birds only at two positions, which are shown bold and underlined (Italian birds, NS5 gene fragment:

```

C T T G G A G C A C G G T A T C T A G A G T T T G A
A G C T T T G G G G T T C C T G A A T G A A G A C C A T T
G G C T G A G C C G A G A G A A Y T C A G G A G G T
G G A G T G G A A G G C T C G G G C G T C C A A A A
G C T A G G A T A C A T C C T C C G T G A C A T A G
C A G G A A A G C A A G G A G G G A A A A T G T ).

```

However, it remains undefined whether the viruses were the same in the two episodes. To this date no human cases of JE have been reported in Italy. Thus, two different hypotheses may be considered:

- Unidentified flaviviruses highly similar to JEV but less or not virulent for humans, are circulating in Italy

(southern Europe). This hypothesis cannot be completely ruled out until further analyses are performed.

- Limited JEV circulation has occurred between birds and mosquitoes in Italy but no human cases have been observed, as in Australia since 1995 [7]. This may be due to the relatively low availability of amplifying hosts (pigs) in that area, low vector competence of European *Culex pipiens* [8], low capability of local birds to maintain a persistent JEV circulation or other factors suppressing the JEV epidemic cycle [1,6], and limited or absent human exposure.

In conclusion, our results seem to support the hypothesis of long distance spread of JEV from endemic areas to Europe (Italy) [1,7]. However, sporadic introduction of JEV to new areas by migratory birds or by other ways may not necessarily lead to local viral circulation. Moreover, the circulation of other flaviviruses closely related to JEV cannot be completely ruled out. Whether JEV represents a human health threat in Europe merits further investigation.

References

1. Erlanger TE, Weiss S, Keiser J, Utzinger J, Wiedenmayer K. Past, present, and future of Japanese encephalitis. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(1):1-7.
2. Ravanini P, Huhtamo E, Ilaria V, Crobu MG, Nicosia AM, Servino L, et al. Japanese encephalitis virus RNA detected in *Culex pipiens* mosquitoes in Italy. *Euro Surveill.* 2012;17(28):pii=20221. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20221>
3. Mani P, Legrottaglie R, Bertelloni F, Fratini F, Filogari D, Rossi G. Il Virus dell'Encefalite Giapponese (JEV) in uccelli selvatici sinantropici (*Passer italiae*, *Turdus merula*, *Sturnus vulgaris*) e da richiamo (*Turdus iliacus*) in Toscana. [The Japanese encephalitis virus (JEV) in synanthropic wild birds (*Passer italiae*, *Turdus merula*, *Sturnus vulgaris*) and redwing (*Turdus iliacus*) in Tuscany]. *Ecologia Urbana.* 2009;21(1):99-100. Italian.
4. Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, et al. West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(12):1372-8.
5. Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina OY, Tyutyunnik EN, Frolochkina TI, Lanciotti RS, et al. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(1):128-32.
6. Platonov AE, Karan LS, Mironov KO, Rossi G. [On the possibility of forming a natural focus of Japanese encephalitis in southern Europe: a genetic investigation]. The 5th All-Russian scientific-practical conference "Genetical diagnostics of infectious diseases." Moscow, 19-21 October 2004. Vol.II. P.182-4. Russian.
7. van den Hurk AF, Ritchie SA, Mackenzie JS. Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus. *Annu Rev Entomol.* 2009;54:17-35.
8. Turell MJ, Mores CN, Dohm DJ, Lee WJ, Kim HC, Klein TA. Laboratory transmission of Japanese encephalitis, West Nile, and Getah viruses by mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected near Camp Greaves, Gyeonggi Province, Republic of Korea 2003. *J Med Entomol.* 2006; 43(5):1076-81.

Usutu Virus, Italy, 1996

Herbert Weissenböck, Tamás Bakonyi,
Giacomo Rossi, Paolo Mani,
and Norbert Nowotny

Retrospective analysis of archived tissue samples from bird deaths in the Tuscany region of Italy in 1996 identified Usutu virus. Partial sequencing confirmed identity with the 2001 Vienna strain and provided evidence for a much earlier introduction of this virus into Europe than previously assumed.

In early fall 1996, an episode of wild bird deaths occurred in the provinces of Florence and Pistoia (Tuscany region), Italy. Several bird species were affected; however, most observed bird carcasses were Eurasian blackbirds (*Turdus merula*). Several animals were subjected to necropsy, which predominantly showed swollen livers and spleens, necrotizing pericloacal dermatitis, and a variety of endoparasites. Bacteriologic, virologic, and toxicologic investigations produced no conclusive results. Formalin-fixed and paraffin wax-embedded tissue samples were archived. This event was reported in an Italian veterinary journal with local distribution and thus did not receive broad attention (1).

Five years later in late summer 2001, similar seasonal deaths of wild birds, again predominantly blackbirds, were observed in neighboring Austria (2). A particular strain of Usutu virus (USUV) was determined as the causative agent of this fatal bird disease outbreak, which recurred in Austria in subsequent years (3), and was later identified in Hungary (4), Switzerland (5), Italy (6), and Germany (7).

There were similarities between 1996 bird deaths in Tuscany and subsequent USUV-associated bird deaths in other areas of Europe. Thus, we retrospectively analyzed archived paraffin wax-embedded material from the Tuscany cases for USUV.

The Study

Thirty-three paraffin blocks generally containing multiple tissue samples (such as brain, liver, spleen, kidney, lung, heart, proventriculus, gizzard, intestine, pancreas, and skeletal muscle) were used for detection of USUV. Most

Author affiliations: University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria (H. Weissenböck, T. Bakonyi, N. Nowotny); Szent István University, Budapest, Hungary (T. Bakonyi); University of Camerino, Matelica, Italy (G. Rossi); University of Pisa, Pisa, Italy (P. Mani); and Sultan Qaboos University, Muscat, Oman (N. Nowotny)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1902.121191>

organ samples were from blackbirds, but some were from other bird species (Table). Tissue blocks were assigned to 4 groups: group 1 (7 blocks, blackbirds found dead or severely ill during August 28–September 25, 1996); group 2 (6 blocks, blackbirds found during October 1–November 19, 1996); group 3 (10 blocks, blackbirds, starlings [*Sturnus vulgaris*], and redwings [*Turdus iliacus*] found during August 3–September 18, 1997); and group 4 (10 blocks, blackbirds and fieldfares [*T. pilaris*] found during October 5–December 20, 1997).

Recut samples from these blocks were placed on positively charged slides (Superfrost plus; Menzel Gläser, Braunschweig, Germany) and processed for immunohistochemical staining by using a rabbit USUV-specific antibody at a dilution of 1:4,000. Immunohistochemical analysis was performed by using an automated immunostainer (Autostainer 360-2D; Thermo-Fisher, Kalamazoo, MI, USA). From the same paraffin blocks, three 10 µm-thick samples were cut and used for RNA extraction.

Viral RNA was purified from paraffin-embedded tissue samples by using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) after deparaffinization with xylene. Because of the formaldehyde fixation, the paraffin wax embedding procedure, and the long storage time, a high degree of RNA fragmentation was expected. Therefore, the PCR-based nucleic acid detection methods were specific for short (<300 nt) sequences.

In a TaqMan-based real-time reverse transcription PCR (RT-PCR), genomic (5'-GCCAATGCCCTGCACCTTT-3') and reverse (5'-TCCCGAGGAGGGTTTCCA-3') primers amplify part of the nonstructural protein 5 (NS5) gene region of USUV between nt positions 9721 and 9795 (according to the USUV complete genome sequence, GenBank accession no. NC_006551). The TaqMan probe (FAM-5'-CGATGTCCAAGGTCAGAAAAGACGTGC-3'-TAMRA) hybridizes the amplification product between nt positions 9746 and 9773. The SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for amplifications according to the manufacturer's instructions. Primers and probe were used at concentrations of 0.2 µmol/L. Reactions were performed in an Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) 7300 Real Time PCR System with a thermal profile of 48°C for 15 min, 95°C for 2 min, and 45 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C, for 30 sec. Selected real-time RT-PCR virus-positive samples were also tested by using conventional RT-PCRs that generated short amplification products. Two primer pairs (Usu9247f-Usu9445r and Usu10626f-Usu10828) (6) amplified specific products.

Nucleotide sequences of real-time and conventional RT-PCR amplification products were determined and identified by using a BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sequences were aligned with USUV sequences

Allegato 3: Articolo di Weissenböck et al. nel quale viene riportato il ritrovamento di RNA di USUV in merli morti in Toscana nel 1996 nei quali era precedentemente stato ritrovato l'RNA di JEV.

Table. Results of IHC analysis and real-time RT-PCR for Usutu virus in birds, Italy, 1996*

| Group, protocol no. | Tissue | Bird species | IHC result | RT-PCR result |
|---------------------|-----------------------------------|---|------------|---------------|
| 1 | | | | |
| 6439-A1 | Lung, kidney, spleen | <i>Turdus merula</i> | + | + |
| 6439-C2 | Brain | <i>T. merula</i> | + | + |
| 6439-C3 | Brain | <i>T. merula</i> | + | + |
| 6439-C4 | Brain | <i>T. merula</i> | + | + |
| 6439-D5 | Proventriculus, gizzard | <i>T. merula</i> | — | + |
| 6439-D6 | Kidney | <i>T. merula</i> | — | + |
| 6439-D7 | Liver | <i>T. merula</i> | I | + |
| 2 | | | | |
| 6484-A | Skeletal muscle | <i>T. merula</i> | — | — |
| 6484-B | Spleen | <i>T. merula</i> | — | — |
| 6484-C | Intestine | <i>T. merula</i> | — | — |
| 6484-D | Liver | <i>T. merula</i> | — | — |
| 6484-E | Heart | <i>T. merula</i> | — | — |
| 6484-F | Lung | <i>T. merula</i> | I | — |
| 3 | | | | |
| 7665-A1 | Brain | <i>T. merula</i> , <i>T. iliacus</i> , <i>Stumus vulgaris</i> † | — | — |
| 7665-A2 | Brain | <i>T. merula</i> , <i>T. iliacus</i> , <i>S. vulgaris</i> † | — | — |
| 7665-B1 | Brain | <i>T. merula</i> , <i>T. iliacus</i> , <i>S. vulgaris</i> † | — | — |
| 7665-B2 | Brain, intestine | <i>T. merula</i> , <i>T. iliacus</i> , <i>S. vulgaris</i> † | — | — |
| 7665-B3 | Liver, lung, kidney | <i>T. merula</i> , <i>T. iliacus</i> , <i>S. vulgaris</i> † | — | — |
| 7665-C1 | Brain | <i>T. merula</i> , <i>T. iliacus</i> , <i>S. vulgaris</i> † | — | — |
| 7665-C2 | Heart | <i>T. merula</i> , <i>T. iliacus</i> , <i>S. vulgaris</i> † | — | — |
| 7665-C3 | Liver, intestine, skeletal muscle | <i>T. merula</i> , <i>T. iliacus</i> , <i>S. vulgaris</i> † | — | — |
| 7665-D1 | Brain | <i>T. merula</i> , <i>T. iliacus</i> , <i>S. vulgaris</i> † | — | — |
| 7665-D2 | Liver, kidney | <i>T. merula</i> , <i>T. iliacus</i> , <i>S. vulgaris</i> † | — | — |
| 4 | | | | |
| 7714-1 | Heart | <i>T. merula</i> , <i>T. pilaris</i> † | — | — |
| 7714-2 | Liver, kidney | <i>T. merula</i> , <i>T. pilaris</i> † | — | — |
| 7714-3 | Spleen, bursa | <i>T. merula</i> , <i>T. pilaris</i> † | — | — |
| 7714-4 | Brain | <i>T. merula</i> , <i>T. pilaris</i> † | — | — |
| 7714-5 | Brain | <i>T. merula</i> , <i>T. pilaris</i> † | — | — |
| 7714-6 | Intestine, pancreas | <i>T. merula</i> , <i>T. pilaris</i> † | — | — |
| 7714-7 | Heart | <i>T. merula</i> , <i>T. pilaris</i> † | — | — |
| 7714-8 | Heart | <i>T. merula</i> , <i>T. pilaris</i> † | — | — |
| 7714-9 | Brain | <i>T. merula</i> , <i>T. pilaris</i> † | — | — |
| 7714-10 | Kidney | <i>T. merula</i> , <i>T. pilaris</i> † | — | — |

*IHC, immunohistochemical; RT-PCR, reverse transcription PCR; +, positive; —, negative; I, inconclusive.

†Blocks not assignable to individual bird species.

available in GenBank. Phylogenetic analysis with the neighbor-joining algorithm was performed to infer genetic relatedness between sequences.

Immunohistochemical analysis showed positive results for USUV in several brain samples (Figure 1) and 1 kidney sample from only group 1 blocks. Liver, lung, spleen, and proventriculus were negative for USUV. In all blocks from the other 3 groups, there was no specific staining.

Results of real-time RT-PCR were positive for all samples from group 1; samples from other groups were negative. Nucleotide sequences of amplification products were 100% identical with available USUV sequences in GenBank. Selected samples (brains for group 1) were also positive by conventional RT-PCRs.

Nucleotide sequences of the amplification products in the partial NS5 gene region (between nt positions 9267 and 9425, excluding primer sequences) were 100% identical with the corresponding sequences of USUV detected in Austria in 2001 and in Italy and in Switzerland in 2006. Sequences were 98.7%–99.3% identical with other USUV

sequences from Austria, Italy, Hungary, and Germany. However, these sequences were only 95.6% identical with USUV detected in Spain in 2009 and 96.2% identical with the reference strain isolated in South Africa in 1959.

Phylogenetic relatedness of sequences is shown in Figure 2. Nucleotide sequences of the 3' untranslated region (between nt positions 10646 and 10808) were 100% identical with USUV sequences from central Europe and 98.1% identical with the reference strain from South Africa.

Conclusions

These investigations provide evidence that USUV emerged in a pathogenic form in Europe in 1996 or even earlier. This date is ≥ 5 years before USUV-associated bird deaths in Vienna, Austria (2), which has been generally assumed to have been the starting point of the spread of the virus to other countries in Europe. Partial sequencing of the 1996 strain confirmed its identity with the 2001 Vienna strain and all its descendants. However, the assumed epicenter of virus spread being Austria must be reconsidered

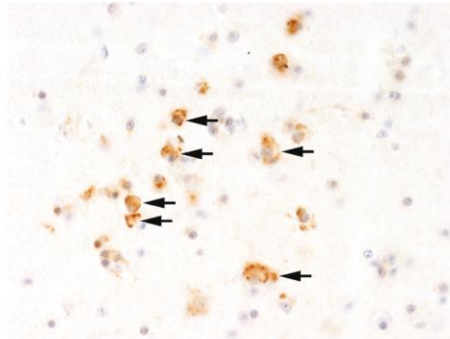


Figure 1. Immunohistochemical staining with Usutu virus-specific antibody showing virus antigen in the brain of a blackbird that died during an Usutu virus outbreak in Italy, 1996. Numerous neurons show characteristic, frequently coarsely granular cytoplasmic labeling (arrows). Original magnification $\times 390$.

because the source has been in Italy much longer and may have given rise to subsequent local episodes of bird deaths in Italy and other countries.

USUV has an established stable mosquito-to-bird transmission cycle in Europe, which can remain silent for many seasons. There are no reports of bird deaths during 1996–2001, which might have been caused by unfavorable climatic conditions or lack of larger numbers of susceptible birds. Local herd immunity (8) prevented further bird deaths and supported silent spread of the virus. Large-scale wild bird deaths, as later reported in Austria, Switzerland, and Germany (2,3,5,7), had not been observed in Italy, despite widespread viral activity (6,9). Introduction of a potentially pathogenic vector-borne virus into a new area does not necessarily lead to immediate deaths, which has been repeatedly shown by seropositivity of sentinel birds or virus detection in vectors before epidemics (10,11). Episodes of bird deaths tend to occur when virus spreads to areas without prior exposure, thus affecting virus-naïve birds. Also, specific climatic conditions, such as longer periods of hot and dry weather, seem to affect vector abundance and competence and efficient virus transmission to susceptible hosts (12).

There is evidence for introduction of other USUV strains into Europe. Direct evidence exists for a strain so far found only in mosquitoes in Spain, which is genetically different from the strain from central Europe (13,14). This strain has never been associated with bird deaths, which might have resulted from its lower virulence, but low levels of bird deaths might have occurred unnoticed. Thus, results of studies in the United Kingdom that reported several USUV seroreactive resident birds without obvious bird deaths may be explained accordingly (15).

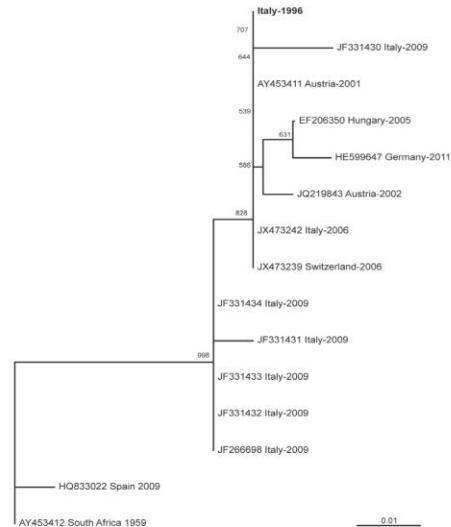


Figure 2. Genetic relationships of partial nonstructural protein 5 nucleotide sequences of Usutu virus, Italy, 1996. Sequences are indicated by codes containing GenBank accession number, country of origin, and year of sample collection. Virus reported in this study is indicated in **boldface**. Bootstrap values ≥ 500 (50%) are displayed. Scale bar indicates genetic distance.

Acknowledgments

We thank Ingrid Friedl for technical assistance.

This study was partially supported by European Union grants HEALTH.2010.2.3.3-3 Project 261391 EuroWestNile (<http://eurowestnile.isciii.es/ewn>) and FP7-261504 EDENext and is cataloged by the EDENext Steering Committee as EDENext069 (www.edenext.eu).

Dr Weissenböck is an associate professor of pathology at the University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria. His research interest is the pathology of infectious diseases, particularly viral infections.

References

1. Mani P, Rossi G, Perrucci S, Bertini S. Mortality of *Turdus merula* in Tuscany [in Italian]. *Selezione Veterinaria*. 1998;8–9:749–53.
2. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:652–6. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0807.020094>

3. Chvala S, Bakonyi T, Bukovsky C, Meister T, Brugger K, Rubel F, et al. Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003–2005. *Vet Microbiol.* 2007;122:237–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.029>
4. Bakonyi T, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Csörgö T, Lussy H, et al. Emergence of Usutu virus in Hungary. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3870–4. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01390-07>
5. Steinmetz HW, Bakonyi T, Weissenböck H, Hatt JM, Eulenberger U, Robert N, et al. Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland: genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Vet Microbiol.* 2011;148:207–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.09.018>
6. Manarolla G, Bakonyi T, Gallazzi D, Crosta L, Weissenböck H, Dorrestein GM, et al. Usutu virus in wild birds in northern Italy. *Vet Microbiol.* 2010;141:159–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.036>
7. Becker N, Jöst H, Ziegler U, Eiden M, Höper D, Emmerich P, et al. Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS ONE.* 2012;7:e32604. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032604>
8. Meister T, Lussy H, Bakonyi T, Šikutová S, Rudolf I, Vogl W, et al. Serological evidence of continuing high Usutu virus (flaviviridae) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria. *Vet Microbiol.* 2008;127:237–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.023>
9. Savini G, Monaco F, Terregino C, Di Gennaro A, Bano L, Pinoni C, et al. Usutu virus in Italy: an emergence or a silent infection? *Vet Microbiol.* 2011;151:264–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.036>
10. Rizzoli A, Rosa R, Rosso F, Buckley A, Gould EA. West Nile virus circulation detected in northern Italy in sentinel chickens. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7:411–7. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2006.0626>
11. Jöst H, Bialonski A, Maus D, Sambri V, Eiden M, Groschup MH, et al. Isolation of Usutu virus in Germany. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85:551–3. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0248>
12. Rubel F, Brugger K, Hantel M, Chvala-Mannsberger S, Bakonyi T, Weissenböck H, et al. Explaining Usutu virus dynamics in Austria: model development and calibration. *Prev Vet Med.* 2008;85:166–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.01.006>
13. Busquets N, Alba A, Allepuz A, Aranda C, Núñez JI. Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:861–3. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1405.071577>
14. Vázquez A, Ruiz S, Herrero L, Moreno J, Molero F, Magallanes A, et al. West Nile and Usutu viruses in mosquitoes in Spain, 2008–2009. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85:178–81. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0042>
15. Buckley A, Dawson A, Moss SR, Hinsley SA, Bellamy PE, Gould EA. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J Gen Virol.* 2003;84:2807–17. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.19341-0>

Address for correspondence: Herbert Weissenböck, Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine, Veterinärplatz 1, Vienna A-1210, Austria; email: herbert.weissenboeck@vetmeduni.ac.at

Allegato 3: Articolo di Weissenböck et al. nel quale viene riportato il ritrovamento di RNA di USUV in merli morti in Toscana nel 1996 nei quali era precedentemente stato ritrovato l'RNA di JEV.

CONCLUSIONI

Il grave episodio di mortalità in uccelli selvatici a fine estate 1996 ha destato grande preoccupazione come testimoniato da articoli pubblicati sui principali quotidiani e da richieste di informazioni da parte della Procura della Repubblica (sezione polizia Giudiziaria Corpo Forestale dello Stato c/o Pretura Circondariale di Pistoia) e da parte della Regione Toscana.

Alla luce dei risultati di questo lavoro e delle recentissime pubblicazioni si evince che il monitoraggio sanitario e gli studi effettuati sui vettori sono risultati fondamentali nel rilevamento di JE Group virus nella nostra regione. Si evidenzia inoltre l'importanza dell'informazione nei piani di prevenzione e controllo, nella raccolta dei materiali e nella corretta gestione dei risultati.

Allo stato attuale risulta evidente come solo un programma di ricerca interdisciplinare possa rispondere ai molti quesiti che la diffusione di virus del gruppo encefalite giapponese pone non solo in Toscana ma anche in altre regioni italiane e in altri paesi europei.

BIBLIOGRAFIA

- Adam, F., Digoutte, J.P., (2005) Virus d'Afrique (base de données). Centre collaborateur OMS de référence et de recherche pour les arbovirus et les virus de fièvres hémorragiques (CRORA), Institut Pasteur de Dakar.
- Autorino G.L., Battisti A., Deubel V., Ferrari G., Forletta R., Giovannini A., Lelli R., Murri S., Scicluna M.T. (2002), "West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy", *Emerging Infectious Diseases*, 8(12), pag. 1372-1378.
- Bakonyi T., Erdelyi K., Ursu K., Ferenczi E., Csorgo T., Lussy H., Chvala S., Bukovsky C., Meister T., Weissenböck H., Nowotny N. (2007), "Emergence of *Usutu virus* in Hungary", *J. Clin. Microbiol.*, 45, pag. 3870-3874.
- Bakonyi T., Erdélyi K., Ursu K., Ferenczi E., Csorgo T., Lussy H., Chvala S., Bukovsky C., Meister T., Weissenböck H., Nowotny N. (2007) "Emergence of *Usutu virus* in Hungary", *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45(12), pag. 3870-3874.
- Barnard B.J., Buys S.B., Du Preez J.H., Greyling S.P., Veneter, H.J. (1980), "Turkey Meningoencephalitis in South Africa", *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 47, pag. 89-94.
- Brault A.C., Huang C.Y., Langevin S.A., Kinney R.M., Bowen R.A., Ramey W.N., Panella N.A., Holmes E.C., Powers A.M., Miller B.R. (2007), "A single positively selected West Nile viral mutation confers increased virogenesis in American crows", *Nat. Genet.*, 39, pag. 1162-1166.
- Braverman Y., Davidson I., Chizov-Ginzburg A., Chastel C. (2003), "Detection of *Israel turkey Meningoencephalitis virus* from mosquito (Diptera: Culicidae) and Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) species and its survival in *Culex pipiens* and *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Phlebotomidae)", *J. Med. Entomol.*, 40, pag. 518-521.
- Braverman Y., Rubina M., Frish K. (1981), "Pathogens of veterinary importance isolated from mosquitoes and biting midges in Israel", *Insect Science and its Application*, 2, pag. 157-161.
- Busquets N., Alba A., Allepuz A., Aranda C., Ignacio Nuñez J. (2008), *Usutu virus* sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain", *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), pag. 861-863.
- Calisher C.H., Gould E.A. (2003), "Taxonomy of the virus family Flaviviridae", *Adv. Virus Res.*, 59, pag. 1-19.
- Calzolari M., Bonilauri P., Bellini R., Albieri A., Defilippo F., Maioli G., Galletti G., Gelati A., Barbieri I., Tamba M., Lelli D., Carra E., Cordioli P., Angelini P., Dottori M. (2010), "Evidence of simultaneous circulation of *West Nile* and *Usutu viruses* in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009", *PLoS One.*, 5(12), pii=14324.
- Capelli G., Drago A., Martini S. (2011), "First report in Italy of the exotic mosquito species *Aedes (Finlaya) koreicus*, a potential vector of arboviruses and filariae", *Parasites Vectors* 2011, 4, pag. 188.

- Cavrini F., Gaibani P., Longo G., Pierro A.M., Rossini G., Bonilauri P., Gerundi G.E., Di Benedetto F., Pasetto A., Girardis M., Dottori M., Landini M.P., Sambri V. (2009), "Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009", *Euro Surveillance*, 14(50), pii=19448.
- Chvala S., Bakonyi T., Bukovsky C., Meister T., Brugger K., Rubel F., Nowotny N., Weissenböck H. (2007), "Monitoring of *Usutu virus* activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003-2005", *Vet. Microbiol.*, 122(3-4), pag. 237-45.
- Dalla Pozza G.L., Romi R., Severini C. (1994) "Source and spread of *Aedes albopictus* in the Veneto region of Italy", *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10, pag. 589-592.
- Felsenstein J. (1993), PHYLIP (Phylogeny Inference Package) 3.5c Manual (computer program), Ed. University of Washington, Dept. of Genetics SK-50, Seattle.
- Figueiredo L.T.M. (2000), "The Brazilian flaviruses", *Microbes infect.*, 2, pag. 1643-1649.
- Filogari D., Fratini F., Bertelloni F., Mani P. (2009), "Causes of mortality in fallow deer (*Dama dama*) and wild boar (*Sus scrofa*) captured in the Natural Park of Migliarino S. Rossore Massaciuccoli", *Wild international Symposium on Wild Fauna, atti del congresso*.
- Fontenille D., Failloux A.B., Romi R. (2007), "Should we expect chikungunya and dengue in Southern Europe? Emerging Pets and Vector-Borne Diseases in Europe". Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pag. 169-184.
- Fulop L.D., Barrett A.D.T., Titball R.W. (1995), "Nucleotide sequence of the NS5 gene of *Banji virus*: comparison with other flaviviruses", *J. Gen. Virol.*, 76, pag. 2317-2321.
- Gould E., Solomon T. (2008), "Pathogenic flaviviruses", *Lancet*, 371, pag. 500-509.
- Hayes E.B. (2009), "Zika virus outside Africa", *Emerg. Infect. Dis*, 15, pag. 1347-1350.
- Hurrelbrink R.J., McMin P.C. (2003), "Molecular determinants of virulence: the structural and functional basis for flavivirus attenuation", *Adv. Virus Res.*, 60, pag. 1-42.
- Johansen C.A., Farrow R.A. (2003), "Collection of wind-borne haematophagous insects in the Torres Strait, Australia", *Med Vet Entomol.*, 17(1), pag. 102-109.
- Karabatsos N. (1985), *International Catalogue of Arboviruses, Including Certain Other Viruses of Vertebrates*, Ed. Collins, San Antonio.
- Kim H.C., Klein T.A., Takhampunya R., Evans B.P., Mingmongkolchai S., Kengluetcha A., Grieco J., Masuoka P., Kim M.S., Chong S.T., Lee J.K., Lee W.J. (2011), "Japanese encephalitis virus in culicine mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected at Daeseongdong, a village in the demilitarized zone of the Republic of Korea", *Virol J.*, 8, pag. 449.
- Kimura, M. (1980), "A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences", *J. Mol. Evol.*, 16, pag. 111-120.
- Komarov A., Kalmar E. (1960), "A hitherto undescribed disease - Turkey Meningoencephalitis", *Vet. Rec.*, 72, pag. 257-261.

- Kono Y., Tsukamoto K., Hamid M.A., Darus A., Lian T.C., Sam L.S., Yok C.N., Di K.B., Lim K.T., Yamaguchi S., Narita M. (2000), "Encephalitis and retarded growth of chicks caused by *Sitiawan virus*, a new isolate belonging to the genus *Flavivirus*", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 63, pag. 94-101.
- Kuno G., Chang G.J. (2007), "Full-length sequencing and genomic characterization of *Bagaza*, *Kedougou*, and *Zika viruses*", *Arch. Virol.*, 152, pag. 687-696.
- Kuwata R., Nga P.T., Yen N.T., Hoshino K., Isawa H., Higa Y., Hoang N.V., Trang B.M., Loan D.P., Phong T.V., Sasaki T., Tsuda Y., Kobayashi M., Sawabe K., Takagi M. (2013), "Surveillance of *Japanese Encephalitis Virus* Infection in Mosquitoes in Vietnam from 2006 to 2008", *Am J. Trop Med Hyg.*, 88(4), pag. 681-688.
- Lanciotti R.S., Kosoy O.L., Laven J.J., Velez J.O., Lambert A.J., Johnson A.J., Stanfield S.M., Duffy M.R. (2008), "Genetic and serologic properties of *Zika virus* associated with an epidemic, Yap state, Micronesia, 2007", *Emerg. Infect. Dis.*, 14, pag. 1232-1239.
- Lee E., Lobigs M. (2000), "Substitutions at the putative receptor-binding site of an encephalitic flavivirus alter virulence and host cell tropism and reveal a role for glycosaminoglycans in entry", *J. Virol.*, 74, pag. 8867-8875.
- Lindahl J., Chirico J., Boqvist S., Thu H.T., Magnusson U. (2012), "Occurrence of *Japanese encephalitis virus* mosquito vectors in relation to urban pig holdings", *Am J. Trop Med Hyg.*, 87(6), pag. 1076-1082.
- Lindenbach B.D., Rice C.M. (2003), "Molecular biology of flaviviruses", *Adv. Virus Res.*, 59, pag. 23-61.
- Liu H., Lu H.J., Liu Z.J., Jing J., Ren J.Q., Liu Y.Y., Lu F., Jin N.Y. (2013), "*Japanese encephalitis virus* in mosquitoes and swine in Yunnan province, China 2009-2010", *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 13(1), pag. 41-49.
- Mani P., Rossi G., Perrucci S., Bertini S. (1998), "Mortality of *Turdus merula* in Tuscany", *La Selezione Veterinaria*, 8(9), pag. 749-753.
- May F.J., Lobigs M., Lee E., Gendle D.J., Mackenzie J.S., Broom A.K., Conlan J.V., Hall R.A. (2006), "Biological, antigenic and phylogenetic characterization of the flavivirus *Alfuy*", *J. Gen. Virol.*, 87, pag. 329-337.
- McLean R.G., Bowen, G.S. (1980), *St. Louis encephalitis*, Ed. T. P. Monath, Washington.
- McMinn P.C. (1997), "The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses", *J.Gen. Virol.*, 78, pag. 2711-2722.
- Medlock J.M., Hansford K.M., Schaffner F., Versteirt V., Hendrickx G., Zeller H., Van Bortel W. (2012), "Update on the invasive mosquitoes of public health concern in Europe", 12(6), pag. 435-447.
- Murgue B., Zeller H., Deubel V. (2002), "The ecology and epidemiology of *West Nile virus* in Africa, Europe and Asia", *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 267, pag. 195-221.
- Nisbet D.J., Lee K.J., Van den Hurk A.F., Johanses C.A., Kuno G., Chang G.J., Mackenzie J.S., Ritchie S.A., Hall R.A. (2005), "Identification of new flaviviruses in the *Kokobera virus* complex", *J. Gen. Virol.*, 86, pag. 121-124.

- Ohno Y., Sato H., Suzuki K., Yokoama M., Uni S., Shibasaki T., Sashika M., Inokuma H., Kai K., Maeda K. (2009), "Detection of Antibodies against *Japanese Encephalitis Virus* in Raccoons, Raccoon Dogs and Wild Boars in Japan", J. Vet. Med. Sci., 71(8), pag. 1035–1039.
- Omilabu S.A., Fagbami A.H., Olaleye O.D. (1989), "Susceptibility of laboratory and domestic animals to experimental infection with *Potiskum virus*", Microbios, 60, pag. 53-58.
- Pecorari M., Longo G., Gennari W., Grottola A., Sabbatini A., Tagliazucchi S., Savini G., Monaco F., Simone M., Lelli R., Rumpianesi F. (2009) "First human case of *Usutu virus* neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009". Euro Surveill, 14(50), pii=19446.
- Perelman B., Kin E., Heifez S., Benet-Noah C., Even-Chen T., Ashash U., Finger S., Perek S. (2012), "Investigation Study of Turkey Meningoencephalitis (TME) Vaccine Failure: Causes and Solutions in the Field", Israel Journal of Veterinary Medicine, 67(3), pag. 154-161.
- Platonov A.E., Rossi G., Karan L.S., Mironov K.O., Busani L., Rezza G. (2012), "Does the *Japanese encephalitis virus* (JEV) represent a threat for human health in Europe? Detection of JEV RNA sequences in birds collected in Italy", Euro Surveill, 17(32), pii=20241.
- Platonov E.A., Documento di risposta ad esami RT-PCR su tessuti di uccelli morti in episodio 1996-97 raccolti nel laboratorio di patologia Aviare della facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa, Comunicazione Personale.
- Ravanini P., Huhtamo E., Ilaria V., Crobu M.G., Nicosia A.M., Servino L. (2012), "*Japanese encephalitis virus* RNA detected in *Culex pipiens* mosquitoes in Italy", Euro Surveill, 17(28), pii=20221.
- Reisen W.K. (2003), "Epidemiology of *St. Louis encephalitis virus*", Adv. Virus Res., 61, pag. 139-183.
- Romi R. (2001) "*Aedes albopictus* in Italia: un problema sanitario sottovalutato", Ann. Ist. Super. Sanità, 37(2), pag. 241-247.
- Romi R., Sabatinelli G., Giannuzzi Savelli L., Zago M., Malatesta R. (1997), "Used tires imported from North America and invasion of *Aedes atropalpus* (Coquillett, 1902) in Italy", J. Am Mosq. Control Assoc., 13, pag. 245-246.
- Russel R.C., Dwyer D.E. (2000), "Arboviruses associated with human disease in Australia", Microbes Infect., 2, pag. 1693-1704.
- Savini G., Monaco F., Terregino C., Di Gennaro A., Bano L., Pinoni C., De Nardi R., Bonilauri P., Pecorari M., Di Gialleonardo L., Bonfanti L., Polci A., Calistri P., Lelli R. (2011), "*Usutu virus* in Italy: an emergence or a silent infection?", Vet Microbiol., 151(3-4), pag. 264-274.
- Schmaljohn A.L., McClain D. (1996), Medical Microbiology, 4th edition, Ed. Baron S., Galveston.
- See E., Tan H.C., Wang D., Ooi E.E., Lee M.A. (2002), "Presence of hemagglutination inhibition and neutralization antibodies to Japanese encephalitis virus in wild pigs on an offshore island in Singapore", Acta Tropica, 81(3), pag. 233–236.
- Severini F., Toma L., Di Luca M., Romi R. (2009), Fragmenta Entomologica, Ed. Università degli Studi di Roma, Roma.

- Shopen R.E. (2003), "Epidemiology of other arthropod-borne flaviviruses infecting humans", *Adv. Virus Res.*, 61, pag. 373-391.
- Sucharit S., Surathin K., Shrestha S.R. (1989), "Vectors of *Japanese encephalitis virus* (JEV): species complexes of the vectors", *Southeast Asian J. Trop Med Public Health*, 20(4), pag. 611-621.
- Swanepoel R., Coetzer J.A.W. (2004), *Infectious Disease of Livestock*, Ed. Oxford University Press, Oxford.
- Tamba M., Bonilauri P., Bellini R., Calzolari M., Albieri A., Sambri V., Dottori M., Angelini P. (2011) "Detection of *Usutu virus* within a *West Nile virus* surveillance program in Northern Italy", *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 11(5), pag. 551-557.
- Theiler, M., Downs W.G. (1973), *The Arthropod-borne Viruses of Vertebrates*, Ed. Yale Univ. Press, New Haven, London.
- Theodore F., Tsai M.J.D. (1990), *Arbovirus Diseases Branch*, Ed. Fort Collins, Colorado.
- Van den Hurk A.F., Ritchie S.A., Johansen C.A., Mackenzie J.S., Smith G.A. (2008), "Domestic pigs and *Japanese encephalitis virus* infection, Australia", *Emerging Infectious Diseases*, 14(11), pag. 1736-1738.
- Vythilingam I., Oda K., Tsuchie H., Mahadevan S., Vijayamalar B. (1994) "Isolation of *Japanese encephalitis virus* from *Culex sitiens* mosquitoes in Selangor, Malaysia, 1994", *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 10(2), pag. 228-229.
- Weissenböck H., Bakonyi T., Rossi G., Mani P., Nowotny N. (2013), "*Usutu virus*, Italy, 1996", *Emerg Infect Dis.*, 19(2), pag. 274-277.
- Weissenböck H., Kolodziejek J., Url A., Lussy H., Rebel-Bauder B., Nowotny N. (2002), "Emergence of *Usutu virus*, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe", *Emerg. Infect. Dis.*, 8(7), pag. 652-656.
- World Health Organization. (2007), *Manual for the Laboratory Diagnosis of Japanese Encephalitis Virus Infection*.

Sitografia

- *Parco San Rossore*, <http://www.parcosanrosso.it>
- *Walter Reed Biosystematics Unit*, <http://www.wrbo.org>

La data dell'ultimo accesso alle URL citate è 6 Aprile 2013.

Sitografia delle Immagini

- *AllPosters*, <http://www.allposters.it>
- *Elicriso.it*, <http://www.elicriso.it>
- *Funsci.com*, <http://www.funsci.com>
- *Ita Servizi*, <http://www.itaservizi.co>
- *Mocrobe Wiki*, <http://www.microbewiki.kenyon.edu>
- *Nanopress*, <http://www.nanopress.it>
- *Technogreen*, <http://www.technogreen.it>
- *Ti presento il Cane*, <http://www.tipresentoilcane.com>